

**Die Bedeutung der Single Nukleotid Polymorphismen des  
IL-23-Rezeptorgens und des NOD2/CARD15-Gens  
im Rahmen der allogenen hämatopoetischen  
Stammzelltransplantation im Kindesalter**

---

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Juliane Intek  
geboren am 17.09.1985  
in Halberstadt

## **Gutachter**

- 1. PD. Dr. med. Bernd Gruhn, OA Hämatologie, Onkologie, Stammzelltransplantation, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena.**
- 2. PD Dr. med. Herbert Sayer, OA Hämatologie, Onkologie, Stammzelltransplantation, Klinik für Innere Medizin II, Jena**
- 3. Prof. Dr. Daniel Steinbach, Leiter Bereich Onkologie, Ulm**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.02.2011**

Meinen Großeltern.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ALG	Antilymphozytenglobulin
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
allo	allogen
AML	akute myeloische Leukämie
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
ARAC	Cytosinarabinosid
AS	Aminosäuren
ATG	Antithymozytenglobulin
Bp	Basenpaar
BU	Busulfan
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CAM	Campath
CARD 15	caspase recruitment domain 15
CD	cluster of differentiation
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CSA	Cyclosporin A
CY	Cyclophosphamid
d	Tag (engl. day)
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dest.	destilliert
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E	Empfänger

EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
EZ	Epithelzellen
f	fraktioniert
FLU	Fludarabin
G	Guanin
G-CSF	Granulozyten-Kolonien stimulierender Faktor
(a/c)GVHD	(akute/ chronische) graft-versus-host disease
GVL-Effekt	graft-versus-leukemia-Effekt
GVT-Effekt	graft-versus-tumor-Effekt
HCL	Chlorwasserstoff
HLA	human leukocyte antigens/ Histokompatibilitätsantigene
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
ID	Identität
Interferon $\gamma$	IFN- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL-23	Interleukin-23
IL-23R	Interleukin-23-Rezeptor
i.v.	intravenös
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LPS	Lipopolysaccharide
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MDP	Muranyl-Dipeptide
MEL	Melphalan
MGB	minor groove binder
MHC	Major-Histokompatibilitäts-Komplex
miH	Minor-Histokompatibilitäts-Antigene

mM	millimolar
mmol	Millimol
MMP 9	Matrix Metalloprotease 9
MTX	Methotrexat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nmol	Nanomol
NOD2	nucleotide-binding oligomerization domain containing 2
NTC	no template control (Negativkontrolle)
PBMZ	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBSZ	periphere Blutstammzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	pondus hydrogenii
PRED	Prednisolon
PRR	pattern recognition receptors
o.g.	oben genannt
OKT3	Muromon ab-CD3
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute
rs	reference SNP ID
RT-PCR	Real-Time PCR
S	Spender
SAA	schwere aplastische Anämie
SDS	sequence detection software
sec	Sekunden
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	Single Nukleotid Polymorphismen
STAT	signal transducer and activator of transcription
SZ	Stammzellen
T	Thymin
TBI	Ganzkörperbestrahlung (engl. total body irradiation)

TEPA	Thiotepa
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRM	treatment related mortality
TYK	Tyrosinkinase
usw.	und so weiter
UVB	Umbilikalvenenblut
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v/v	volume in volume
vgl.	vergleiche
VP-16	Vepesid-16 (Etoposid)
vs.	versus (gegen, im Vergleich zu)
Wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Die hämatopoetische Stammzelltransplantation	4
2.1.1	Das HLA-System	5
2.2	Graft-versus-host disease	6
2.2.1	Einteilung	6
2.2.2	Klinik	7
2.2.3	Pathomechanismus und Risikofaktoren	9
2.2.4	Prophylaxe	12
2.2.5	Therapie	12
2.3	Single Nukleotid Polymorphismen des IL-23-Rezeptorgens und des NOD2/CARD15-Gens	13
2.3.1	Aufbau und Wirkmechanismus des Interleukin-23-Rezeptors	14
2.3.2	Aufbau und Wirkmechanismus des NOD2/CARD15-Rezeptors	16
<b>3</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Patienten, Materialien und Methoden</b>	<b>19</b>
4.1	Patienten	19
4.2	Materialien	21
4.3	Methoden	23
4.3.1	DNA – Extraktion	23
4.3.1.1	Vorbereitung	24
4.3.1.2	Durchführung	24
4.3.1.3	Konzentrationsmessung	25
4.3.2	Real-Time PCR	26
4.3.2.1	Prinzip der Methode	26
4.3.2.2	Vorbereitung	29
4.3.2.3	Durchführung	29
4.3.3	DNA-Sequenzierung	33
4.3.3.1	Prinzip der Methode	33
4.3.3.2	Vorbereitung	33
4.3.3.3	Durchführung	34
4.3.4	Statistische Auswertung	34
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
5.1	Häufigkeit der Single Nukleotide Polymorphismen	36
5.2	GVHD	36
5.2.1	Häufigkeit	36
5.2.2	Der Einfluss von Single Nukleotid Polymorphismen auf die akute GVHD	37
5.2.2.1	Bedeutung des IL-23R-SNPs beim Spender	37
5.2.2.2	Bedeutung des IL-23R-SNPs beim Empfänger	41
5.2.2.3	Bedeutung der NOD2/CARD15-SNPs	41
5.2.3	Der Einfluss von Single Nukleotid Polymorphismen auf die chronische GVHD	42
5.3	Überlebenszeitanalyse	43



5.4	Patienten unter 16 Jahre	44
5.5	DNA-Sequenzierung	45
5.5.1	Patient Nr. 245	45
5.5.2	Patient Nr. 246	47
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
6.1	Inhaltliche Diskussion	50
6.1.1	Häufigkeit der untersuchten SNPs bei Spender und Empfänger	51
6.1.2	GVHD und der IL-23R-Genpolymorphismus R381Q	52
6.1.3	NOD2/CARD15-Genpolymorphismen und GVHD	57
6.1.4	Überlebenszeitanalyse	61
6.1.5	Grunderkrankung und Alter der Patienten	63
6.1.6	Konditionierung, Prophylaxe und Stammzellquelle	66
6.2	Methodische Diskussion	68
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>88</b>
9.1	Tabellenverzeichnis	88
9.2	Abbildungsverzeichnis	89
9.3	Curriculum vitae	90
9.4	Ehrenwörtliche Erklärung	92
9.5	Danksagung	93

# 1 Zusammenfassung

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-HSZT) stellt für viele Kinder mit Grunderkrankungen aus der Hämatologie/Onkologie, Rheumatologie und Immunologie oftmals die einzig kurative Therapieoption dar.

Die graft-versus-host disease (englisch, Transplantat-gegen-Empfänger Krankheit, GVHD) ist eine der Hauptkomplikationen der allogenen HSZT, die auch im Jahr 2010 trotz optimierter und individualisierter Therapiekonzepte eine erhöhte Morbidität und Mortalität zur Folge hat. Dabei ist die Auswahl eines passenden Spenders für die Prognose des Patienten, nach allogener HSZT eine GVHD zu entwickeln, entscheidend. Neben den bekannten Einflussfaktoren wie der HLA-Kompatibilität wird aktuell auch die Bedeutung von Single Nukleotid Polymorphisms (SNPs) bei Spender und Empfänger diskutiert.

In dieser Arbeit sollte im speziellen die Bedeutung der SNPs des Interleukin-23-Rezeptorgens (IL-23R) und des NOD2/CARD15-Gens (nucleotide-binding oligomerization domain containing2/caspase recruitment domain15) beim Spender und Empfänger nach allogener HSZT betrachtet werden.

Dafür wurde Material von 231 Spender-Empfänger-Paaren untersucht, deren Transplantation im Zeitraum von 1982 bis 2007 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin stattfand.

Es erfolgte die DNA-Extraktion und die Analyse mittels Taq®Man Real-Time PCR (polymerase chain reaction, engl., Polymerase-Kettenreaktion) zum Nachweis eines SNPs.

Interessanterweise fand sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des IL-23R-Polymorphismus beim Spender und dem Auftreten einer akuten GVHD (Spearman Korrelationskoeffizient  $p = 0,024$ ). Patienten, deren Spender Träger des IL-23R-SNPs war, hatten eine signifikant niedrigere Inzidenz der akuten GVHD Grad II-IV (5 % vs. 33 %, Exakter Test nach Fisher  $p = 0,009$ ).

Bei 5 Paaren ergab sich die Konstellation, dass Spender und Empfänger Träger der IL-23R-1142G>A-Variante waren. In diesen Fällen wurde keinerlei Symptomatik einer GVHD dokumentiert.

Bei der Betrachtung der drei NOD2/CARD15-Genpolymorphismen fand sich im Gegensatz zur aktuellen Literatur in unserer Patientengruppe weder ein Hinweis

auf einen protektiven noch auf einen prädispositionierenden Einfluss dieser SNPs auf die Inzidenz der akuten GVHD.

In dieser Arbeit konnte kein Einfluss der vier untersuchten SNPs auf die Inzidenz der chronischen GVHD oder auf das Gesamtüberleben der Patientengruppe nachgewiesen werden.

Somit wurde in dieser Arbeit erstmals der mögliche protektive Einfluss des IL-23R-SNPs auf den Schweregrad der akuten GVHD nach allogener HSZT im Kindesalter beschrieben. Die Erkenntnisse könnten besonders für Patienten von klinischer Bedeutung sein, bei denen ein graft-versus-tumor-Effekt (GVT) nicht im Vordergrund steht. Bestünde die Möglichkeit zwischen mehreren HLA-identischen Spendern zu wählen, könnte ein Spender, bei dem der IL-23R-SNP nachgewiesen wurde, die Wahrscheinlichkeit einer akuten GVHD deutlich reduzieren und somit entscheidenden Einfluss auf den Verlauf nach allogener HSZT im Kindesalter haben.

Denkbar wäre auch die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers, der medikamentös den Signalweg des Interleukin-23 blockiert und infolge dessen die Symptomatik der akuten GVHD beim Empfänger mildern könnte. Dazu bedarf es in Zukunft weiterer Untersuchungen mit größeren Patientenzahlen.

## 2 Einleitung

In den nächsten fünf Jahren soll sich die Anzahl der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantationen weltweit verdoppeln. Daraus resultierend muss auch mit einer erhöhten Inzidenz der Hauptkomplikation der allogenen HSZT (allo-HSZT) gerechnet werden, der GVHD (Ferrara et al. 2009).

Trotz intensiver Forschung, optimierter Prophylaxekonzepte und zertifizierter Transplantationszentren erkranken nach wie vor zwischen 27-83 % der Kinder nach Transplantation an der akuten Form der GVHD, welche in 50 % der Fälle heute noch tödlich endet (Ferrara et al. 1991 und 2009, Kelemen et al. 1993, Xu et al. 1996).

Die Einflussfaktoren dieser Erkrankung sind komplex und jede Therapieplanung erfordert ein individualisiertes Vorgehen mit genauer Abwägung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses (Paczesny et al. 2009). Denn man weiß bereits seit 1976, dass mit der GVHD auch ein T-Zell-vermittelter graft-versus-leukemia- (engl., Transplantat-gegen-Leukämie, GVL) bzw. GVT-Effekt einhergeht, der durch die Eliminierung residueller Tumorzellen einen wichtigen Bestandteil der Heilung maligner hämatopoetischer Erkrankungen darstellt (Truitt et al. 1976, 1978).

Ziel der Forschungen ist es deshalb, das Gleichgewicht zwischen GVHD und GVT-Effekt so zu optimieren, dass vorzugsweise ein hoher GVL-Effekt der GVHD überwiegt. Dafür sind weitere Erkenntnisse auf der molekularbiologischen Ebene des Pathomechanismus der GVHD essentiell.

Ein Ansatzpunkt, das GVHD-Risiko nach allogener HSZT selektiv zu minimieren, könnten die so genannten Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) beim Spender und/oder Empfänger sein (Elmaagacli et al. 2008). Im Speziellen soll daher in den folgenden Abschnitten auf die Single Nukleotid Polymorphismen des Interleukin-23- Rezeptorgens und des NOD2/CARD15-Gens eingegangen werden.

Des Weiteren folgt einleitend die Darstellung der HSZT im Kindesalter und ihrer Hauptkomplikation, der GVHD. Dafür soll die Komplexität der Faktoren, welche die GVHD und damit den Erfolg der HSZT beeinflussen, aufgezeigt und aktuelle Prophylaxe- und Therapiemöglichkeiten vorgestellt werden.

## **2.1 Die hämatopoetische Stammzelltransplantation**

Die Indikation zur allogenen HSZT wird bei Kindern mit den verschiedensten Grunderkrankungen gestellt. Es sind Patienten, die beispielsweise dem Hochrisikoarm der Therapie einer malignen, hämatopoetischen Erkrankung zugeordnet werden, das therapieresistente Vollbild einer selektiven Autoimmunerkrankung zeigen oder unter einem genetischen Immundefekt, wie dem Wiskott-Aldrich-Syndrom leiden. Für sie ist die Stammzelltransplantation oftmals die einzig kurative Therapieoption. (Thomas et al. 1999, Talmadge et al. 2003).

In Abhängigkeit des Spenders erfolgt die Einteilung in eine autologe, allogene, syngene und haploidentische Transplantation. Die seltene Form der syngenischen Transplantation bezeichnet die Spende von einem eineiigen Zwilling und ist in der Praxis selten. Stammen die Zellen des Transplantats (engl. graft) vom Empfänger selbst, so spricht man von einer autologen SZT. Sie spielt besonders bei soliden Tumoren, die einer Therapie mit Hochdosischemotherapie bedürfen, eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit wurde sich auf die Transplantation von Stammzellen (SZ) eines genetisch nicht identischen Spenders konzentriert, der so genannten allogenen HSZT. Findet sich kein HLA-identischer Spender, kann auch auf SZ der Eltern zurückgegriffen werden und eine haploidentische Transplantation erfolgen (Zintl et al. 1988a/b, Speer et al. 2005).

Des Weiteren lässt sich die HSZT nach der Herkunft der Stammzellen unterteilen. Die Zellen werden entweder mittels Punktion aus dem Knochenmark (KM) des Spenders gewonnen oder medikamentös durch die Gabe von granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) aus dem Knochenmark als periphere Blutstammzellen (PBSZ) mobilisiert (Bensinger et al. 1995, Wagner et al. 2010). Seit 1988 dient als dritte Stammzellquelle auch Umbilikalvenenblut (UBV, Broxmeyer et al. 1989).

### 2.1.1 Das HLA-System

Bei der Entscheidung über die Gewebeverträglichkeit des Transplantats spielen die auf Chromosom 6 codierten Gene eine entscheidende Rolle, weshalb man den Locus Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) nennt (Beck et al. 2000). Beim Menschen werden sie auch als HLA (human leukocyte antigens) bezeichnet und stellen den am stärksten polymorphen Genort dar, was die Schwierigkeit des Findens eines identischen Spenders außerhalb der Familie nachvollziehbar werden lässt (Zintl 1988a und 1988b, Ottinger et al. 1994, 2003, Beck et al. 2000, Johnson et al. 2001).

Aufgrund von Struktur – und Funktionsunterschieden teilt man die MHC-Moleküle in drei Klassen ein. Während MHC-I-Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert werden, finden sich MHC-II-Moleküle nur auf Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), wie den dendritischen Zellen (DZ), Makrophagen und B-Zellen. Beide Moleküle präsentieren in strukturell verschiedenen „Peptidbindungstaschen“ Peptidfragmente, die beim MHC-I eine definierte Länge haben (8-10 Aminosäuren, AS) und aus dem eigenen Zytoplasma stammend an der Zelloberfläche präsentiert werden, um dort mit CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu interagieren. Somit gewährleistet das HLA-System durch Antigenpräsentation an T-Zellen die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd (Bjorkman et al. 1990, Klein et al. 2000).

MHC-II-Moleküle hingegen präsentieren extrazelluläre Antigene, z.B. von Bakterien und Toxinen stammend, die in ihrer Aminosäurenlänge variabel (12-25 AS) sind und mit CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (T-Helferzellen) interagieren. Es folgt die gezielte Immunantwort mit Abwehr des Erregers und Bildung eines „Immungedächtnisses“. Zu den MHC-III-Molekülen gehören Serumproteine des Komplementsystems, aber auch die Tumornekrosefaktoren  $\alpha$  und  $\beta$  (TNF- $\alpha$ , - $\beta$ ).

Die Gene des MHC-I und II-Locus kodieren insgesamt sechs Proteine (HLA-A, -B, -C, -DP, -DQ, -DR), so dass es bei jedem Menschen aufgrund eines väterlichen und eines mütterlichen Chromosoms 12 Allele gibt (Brown et al. 1993, Engelhard et al. 1994, Choo et al. 2007).

Die Gemeinsamkeit der Allele für die Region A, B, C, DR und DQ ist für ein erfolgreiches Anwachsen der Spenderzellen (engl. engraftment) entscheidend. Unterschiede erhöhen neben der Gefahr der Abstoßung auch das Risiko für eine GVHD. Gefordert wird heute im Hinblick auf diese Problematik eine Übereinstimmung von mindestens neun von zehn Allelen bei nicht-verwandten Spendern (Beatty et al. 1985, Anasetti et al. 1989, Petersdorf et al. 1997, Lioseau et al. 2007).

In zahlreichen Arbeiten mit unterschiedlichen malignen und hereditären Grunderkrankungen konnte belegt werden, dass das Risiko für die Entwicklung einer schwergradigen, akuten GVHD nach HSZT, um 20-30 % vermindert werden konnte, wenn das Spendermaterial von HLA-identischen Geschwisterkindern stammte (Storb et al. und Biggs et al. 1992, Chao et al. 1993 und 1998, Hansen et al. 1998, Ferrara et al. 2000). Da sich durch die haploidentische Vererbung mit kodominanter Expression der Proteine nach Mendel lediglich eine 25 %-ige Wahrscheinlichkeit ergibt, genotypisch identisch zu sein, erfolgt die Suche nach einem HLA-identischen Fremdspender durch internationale Datenbanken (Choo et al. 2007).

Neben dem Wissen über die Bedeutung der MHC-Kompatibilität, wird auch zunehmend über den Einfluss der minor histocompatibility antigens (miHs) auf die Entstehung der GVHD diskutiert (Den Haan et al. 1995, Goulmy et al. 1996, Paczesny et al. 2009).

## **2.2 Graft-versus-host disease**

Neben der Gefahr der Abstoßung des Transplantats (engl. graft failure) und dem erhöhten Risiko von Bakterien-, Pilz- und Virusinfektionen nach allogener HSZT ist eine der Hauptkomplikationen Gegenstand dieser Arbeit, die GVHD.

### **2.2.1 Einteilung**

Lange Zeit erfolgte die strenge Einteilung der GVHD in eine akute und chronische Form abhängig von der klinischen Manifestation vor (akut) oder nach (chronisch) Tag 100 nach HSZT. Prophylaxemaßnahmen im Erwachsenenalter, wie „reduced-intensity conditioning“ (engl., reduzierte Intensität der Konditionierung) führten dazu, dass auch noch nach Tag 200 nach Transplantation Symptome der akuten GVHD auftraten. Infolge dessen wurden so genannte „Overlap-Syndroms“ (engl., überlappende Syndrome) von akuter und chronischer GVHD dokumentiert, die eine Überarbeitung dieser Einteilung zwingend erforderlich machten (Ferrara et al. 2009). Von 2005 bis 2008 arbeiteten daraufhin die Gruppen um Filipovich und Griffith des National Institutes of Health Consensus Development Projects daran, die akute und chronische GVHD vor allem durch charakteristische klinische, immunologische und histologische Kriterien zu definieren (Filipovich et al. 2005, Griffith et al. 2008, Ferrara 2009).

## 2.2.2 Klinik

Hauptmanifestationsorte der akuten GVHD sind Haut, Leber und Magen-Darm-Trakt (Glucksberg et al. 1974, Martin et al. 2003). Die Schädigungen der einzelnen Organe (unterteilt in Stadium 1-4, s. Tabelle 1) werden zusammengefasst und daraus resultierend erfolgt die Einteilung der akuten GVHD in Grad I-IV (s. Tabelle 2).

Tabelle 1: Stadieneinteilung der betroffenen Organe. Vergleiche Glucksberg et al. 1974.

Organ	Stadium	(Para-)Klinik
Haut	1	Makulopapulöses Erythem < 25 % der Körperoberfläche
	2	Makulopapulöses Erythem 25-50 % der Körperoberfläche
	3	Generalisiertes Erythem
	4	Generalisiertes Erythem, oft mit Abschuppung und Blasenbildung
Leber	1	Bilirubin 2,0-3,0 mg/dl
	2	Bilirubin 3,1-6,0 mg/dl
	3	Bilirubin 6,1-15,0 mg/dl
	4	Bilirubin > 15 mg/dl
Magen-	1	> 30ml/kg KG oder > 500ml Diarrhoe/Tag
Darm-	2	> 60ml/kg KG oder > 1000ml Diarrhoe/Tag
Trakt	3	> 90ml/kg KG oder > 1500ml Diarrhoe/Tag
	4	> 90ml/kg KG oder > 2000ml Diarrhoe/Tag oder
		schwere Angina abdominalis mit /ohne Ileussympomatik



Tabelle 2: Schweregradeinteilung der akuten GVHD nach Organmanifestation.  
MDT = Magen-Darm-Trakt. Vergleiche Goker et al. 2001

Grad	Haut	Leber		MDT
I	1 bis 2	0	und/oder	0
II	1 bis 3	1	und/oder	0 bis 1
III	2 bis 3	2 bis 4	und/oder	2 bis 3
IV	3 bis 4	2 bis 4	und/oder	2 bis 4

Als erstes und häufigstes Symptom zeigt sich bei Erwachsenen, wie auch bei Kindern ein makulopapulöser Ausschlag, der vor allem Handflächen und Fußsohlen, sowie Ohren, Hals und Schultern betrifft und ungefähr zeitgleich mit dem Anwachsen der Stammzellen auftritt. Angefangen vom leichten Juckreiz und Sonnenbrand ähnlichen Erythem, bis hin zur Blasenbildung mit epithelialen Nekrosen kann es zur Konfluation der betroffenen Hautareale und zur Funktionseinschränkung mit hochgradiger Infektionsgefahr kommen (Vogelsang et al. 2003). Differentialdiagnostisch müssen immer eine infektiöse Ursache oder Nebenwirkungen der Medikation mit in Betracht gezogen werden (Goker et al. 2001, Ferrara et al. 2009).

Parallel zur kutanen Manifestation kann es posttransplantationär zum Anstieg von konjugiertem Bilirubin und alkalischer Phosphatase als Ausdruck der Schädigung der kleinen Gallengänge und resultierender Cholestase kommen. Die Diagnose sichernde Biopsie ist zum Zeitpunkt der Krankheit meist aufgrund des erhöhten Blutungsrisikos nach HSZT kontraindiziert (Goker et al. 2001).

Klinisch oft am schwersten zu beherrschen und charakterisiert durch zahlreiche Durchfälle, die initial wässrig sind, im Verlauf sogar transfusionspflichtige Blutbeimengungen beinhalten können und mit schweren abdominalen Krämpfen einhergehen, ist die Manifestation der akuten GVHD im intestinalen Bereich (Chao et al. 1999). Eine umfassende Diagnostik (Sonografie Abdomen, Stuhlkultur, Endoskopie etc.) ist erforderlich, um eine bakterielle Ursache beispielsweise in Form einer Infektion mit *Clostridium difficile* oder Nebenwirkungen des Konditionierungsregime differentialdiagnostisch abzuklären (Goker et al. 2001).

Neben den drei in der Literatur beschriebenen Hauptmanifestationsorten Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt kann auch das blutbildende System inklusive Lymphknoten involviert sein. Bereits 1986 beschrieben Iwasaki et al. bei experi-

mentellen Versuchen an Mäusen eine Beeinträchtigung der Hämatopoese mit Abfall der Zellen des Blutbilds, im Besonderen der Thrombozyten. Sale et al. ergänzten 1992 diese theoretischen Untersuchungen mit ihren Erkenntnissen über ein abnormes  $CD4^+/CD8^+$ -Verhältnis in Blutbahn und Lymphknoten und ein daraus resultierendes erhöhtes Risiko für schwere Infektionsverläufe (Iwasaki et al 1986, Sale et al. 1992, Goker et al. 2001).

Teilweise aus einer akuten GVHD (aGVHD) resultierend oder aber als de novo Erkrankung zeigt sich die chronische GVHD (cGVHD) meist zuerst im Bereich der Mundschleimhäute (Ferrara et al. 2009). Es können hier analog einer autoimmunen Pathogenese alle Organe beteiligt sein, was dazu führt, dass die chronische GVHD die Haupttodesursache im rezidivfreien Intervall nach Transplantation ist (Lee et al. 2002).

### **2.2.3 Pathomechanismus und Risikofaktoren**

Bereits 1966 postulierte Billingham in seinen Harvey Lectures die heute noch gültigen immunologischen Grundvoraussetzungen einer GVHD:

- (I) Das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten.
- (II) Der Empfänger muss dem Transplantat als „fremd“ erscheinen.
- (III) Der Empfänger muss in seiner Abwehr so geschwächt sein, dass der Angriff des Transplantats nicht abgewehrt werden kann (Billingham et al. 1966).

Über vierzig Jahre später haben zahllose Forschungsarbeiten das Wissen über den Pathomechanismus der GVHD immer weiter präzisiert, so dass der folgende Abschnitt lediglich einen Überblick geben kann.

Grundsätzlich kann man den die pathophysiologischen Vorgänge in 3 Phasen teilen:

1. Konditionierung
2. Induktion und Expansion
3. Effektorphase.

Die Intensität der myeloablativen Konditionierung und der Einsatz von fraktionierter oder Ganzkörperbestrahlung sind entscheidende Faktoren, welche die Vulnerabilität des Gewebes erhöhen und zu ausgeprägten Gewebeschädigungen führen

können (1). Aktivierte Zellen sezernieren infolge dessen vermehrt proinflammatorische Zytokine, wie IL-1, TNF- $\alpha$  und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ , Chao et al. 1997, Ferrara et al. 1999, Paczesny et al. 2009). Zusätzlich verstärkt diese Entzündungsreaktion die Antigenpräsentation des Empfängers auf den MHC-Molekülen (Hill et al. 1997).

Dies führt in Phase 2 dazu, dass T-Lymphozyten des Spenders die Antigene des Empfängers als fremd erkennen (Korngold et al. 1978). Ihre Aktivierung und Expansion erfolgt in den sekundär lymphatischen Organen vor allem durch den Kontakt mit dendritischen Zellen (Banchereau et al. 1998). Anschließend migrieren die aktivierten T-Zellen in die Organe und initiieren dort durch Freisetzung von Chemokinen die Effektorphase (Cyster et al. 2005).

CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>- und zytotoxische T-Zellen (CTLs), sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und ihre proinflammatorischen Moleküle induzieren den letzten Schritt der Kaskade, die Zellapoptose. Perforine und Granzyme der CTLs, sowie die Bindung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an Fas-Liganden der Zelle sind die Hauptmechanismen (Kagi et al. 1994, van den Brink et al. 2002, Paczesny et al. 2009).

In der Literatur wird die Pathophysiologie der GVHD häufig auch in eine afferente und eine efferente Phase unterteilt, wobei die afferente die Mechanismen beim Empfänger vor Transplantation (u.a. Konditionierung) und die efferente Phase die Abläufe nach Transplantation beinhaltet (Paczecny et al. 2009).

Um Fortschritte in der Behandlung zu erzielen, ist es wichtig, die komplexen Risikofaktoren zu kennen, die zur Entstehung der GVHD beitragen.

Neben der bereits beschriebenen Bedeutung der Histokompatibilität zwischen Empfänger und Spender und der Gewebsschädigung durch das Konditionierungsregime, haben sich die folgenden Einflussfaktoren in zahlreichen Arbeiten als relevant erwiesen:

- (1) antibiotische Dekontamination
- (2) Patienten- und Spenderalter
- (3) Verhältnis Geschlecht Spender-Patient
- (4) Spendermaterial
- (5) initialer Krankheitszustand
- (6) virale Infektionen bei Spender und Patient

- (7) Zustand nach Splenektomie beim Patienten
- (8) Multitransfusionen des Patienten
- (9) Prophylaxemedikation

Neben einer medikamentösen, antimikrobiellen Dekontamination zur Sanierung der Darmflora (1, Goker et al. 2001) haben multivariate Analysen gezeigt, dass Alter und Geschlecht von Spender und Empfänger einen prognostischen Wert für den Verlauf nach HSZT haben (2). Bereits 1986 veröffentlichte die Gruppe um Klingemann et al. Daten, in denen Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation 45 Jahre und älter waren, signifikant häufiger eine akute GVHD Grad III und IV ausbildeten als die Patienten der Vergleichsgruppe, die 20 Jahre oder jünger waren (Klingemann et al. 1986). Interessanterweise konnten bereits ein Jahr später Gale et al. diese Ausführungen um einen weiteren Aspekt ergänzen (3): Ergab sich zwischen Spender und Empfänger die Konstellation, dass sie unterschiedlichen Geschlechts und dabei insbesondere der Spender eine Frau und der Empfänger ein Mann waren, so stieg die Wahrscheinlichkeit um bis zu 68 %, dass der Patient nach Transplantation an einer akuten GVHD erkrankte (Gale et al. 1987, Weisdorf et al. 1991).

Immer wieder wird heute kontrovers diskutiert, ob das verwendete Spendermaterial zur Ausbildung einer GVHD prädispositioniert (4). So ergab sich in den meisten Arbeiten kein signifikanter Unterschied zwischen der Verwendung von allogenen, HLA-identischen Knochenmark oder peripheren Blutstammzellen (PBSZ). Lediglich eine Tendenz zum gehäuften Nachweis von chronischer GVHD bei der Verwendung von allogenen PBSZ wurde in verschiedenen Arbeiten diskutiert (Storek et al. 1997, Blaise et al. 2000, Powles et al. 2000). Interessanterweise fanden sich bei dem Vergleich von nicht-HLA-identischem Knochenmark mit Nabelschnurblut mildere Verläufe der akuten GVHD bei Patienten, die SZ aus Nabelschnurblut erhielten (Rubinstein et al. 1998).

Des Weiteren weiß man heute, dass der initiale Krankheitszustand des Empfängers (5), eine chronische myeloische Leukämie als Grunderkrankung, positive Cytomegalievirus (CMV) - Serologien bei Spender und Empfänger (6), Splenektomie beim Patienten (7) und die Gabe von Multitransfusionen vor Transplantation (8) das Risiko, an einer akuten GVHD zu erkranken, deutlich steigern (Chao et al. 1999, Sullivan et al. 1999).

Senken konnte man hingegen die Inzidenz durch die Gabe von Prophylaxemedikation in verschiedenen Kombinationstherapien, die im folgenden Kapitel dargestellt werden (9).

## **2.2.4 Prophylaxe**

Barrett und Le Blanc postulierten in ihrer 2008 veröffentlichten Arbeit zum Thema Prophylaxe der GVHD:

„Die Entwicklung einer GVHD kann an zwei Stellen unterbrochen werden:

(I) Selektion der zu spendenden Zellen und

(II) Modulierung des posttransplantationärem Milieus“ (Barrett et al. 2008).

Basierend auf dem Wissen über die zentrale Rolle der T-Lymphozyten des Spenders gibt es drei klinische Hauptanwendungsgebiete zu Punkt (I): a) Die T-Zelldepletion, b) die CD<sup>34+</sup>-Selektionierung des Transplantats in vitro, sowie c) die Gabe von Antikörpern in vivo vor der Transplantation (Ferrara et al. 2009). Einer deutlich reduzierten Inzidenz von schwerer GVHD stehen jedoch erhöhtes graft failure und vermehrte Rezidiv- und Infektionsgefahr des Empfängers gegenüber (Martin et al. 1988, Bacigalupo et al. 2001, Barge et al. 2006).

Zur medikamentösen Prophylaxe der GVHD und der daraus resultierenden „Modulierung des posttransplantationärem Milieus“ sind Calcineurininhibitoren (Cyclosporin A, CSA), Mycophenolat Mofetil und Methotrexat (MTX) die medikamentösen Therapien mit der besten Datenlage (Ferrara et al. 2009).

## **2.2.5 Therapie**

Der Goldstandard für die Behandlung der akuten GVHD sind Kortikosteroide, welche bei über 50 % der Patienten ein Voranschreiten der Symptomatik verhindern können (MacMillan et al. 2002). Ausgehend von der Pathophysiologie der GVHD erfolgt zudem der Einsatz von TNF- $\alpha$ -Blockern. Dieser lösliche TNF- $\alpha$ -Rezeptor 2 erhöht in Kombination mit Methylprednisolon die Heilungsaussichten der akuten GVHD auf bis zu 80 % (Levine et al. 2008).

Eine weiterer Ansatz zur selektiven Eliminierung der alloreaktiven T-Zellen des Transplantats durch alkylierende Substanzen und Bestrahlung mit ultraviolettem Licht, findet sich in der extrakorporalen Photopherese (Greinix et al. 2006, Gatza et al. 2008).

Schwieriger verhält es sich bei der Therapie der chronischen GVHD. Kortikosteroide gehören zwar auch hier zur First-line-Therapie (engl., Mittel der ersten Wahl), sind aber durch ihre Nebenwirkungen (u.a. erhöhte Infektionsgefahr) kein geeignetes Medikament als Dauertherapie (Ferrara et al. 2009).

Eine Symptomlinderung im Bereich der Haut, der Leber, der Mundschleimhaut, der Augen und der Lunge ist durch die extrakorporale Photopherese möglich (Couriel et al. 2006).

## 2.3 Single Nukleotid Polymorphismen des IL-23-Rezeptorgens und des NOD2/CARD15-Gens

Die weltweite Analyse des menschlichen Genoms brachte die Erkenntnis, dass sich menschliche Individuen am stärksten in ihrer DNA-Sequenz durch den Austausch von einzelnen Basenpaaren, den so genannten Single Nukleotid Polymorphismen unterscheiden. Sie kommen aller 1200-1500 Basenpaare (Bp) vor, jedoch weniger als ein Prozent dieser Polymorphismen bedingt tatsächlich die Veränderung einer Proteinfunktion.

Die Sequenzvarianten des IL-23R-SNPs und der untersuchten NOD2/CARD15-SNPs sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Veränderungen der Gensequenz beim IL-23R-SNP und den NOD2/CARD15-SNPs.

SNP	Sequenzvarianz	Base Wildtyp	Base SNP
IL-23R-SNP	Transition	Guanin	Adenin
NOD2/CARD15-SNP 8	Transition	Cytosin	Thymin
NOD2/CARD15-SNP 12	Transversion	Guanin	Cytosin
NOD2/CARD15-SNP 13	Insertion		Cytosin

Die Transition beim IL-23R-SNP führt zum Austausch der Aminosäure (AS) Arginin durch Glutamin. Dies hat eine Unterbrechung des unten beschriebenen IL-23

Signalwegs zur Folge. Ähnlich verhält es sich beim SNP 13 des NOD2/CARD15-Rezeptorgens. Die zusätzliche Base am Ende der Nukleotidsequenz verändert das Leseraster des Gens (Frameshift-Mutation). Anstelle der vorher verschlüsselten Aminosäure entsteht ein Stopp-Codon und die Transkription bricht ab. Welche Folgen SNP 8 und 12 für die Proteinfunktion des NOD2/CARD15-Gens haben, ist derzeit noch nicht sicher geklärt. Aber auch sie werden als Suszeptibilitätsgene bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen diskutiert (Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001).

### 2.3.1 Aufbau und Wirkmechanismus des Interleukin-23-Rezeptors

Das IL-23R-Gen liegt auf Chromosom 1p31.2-32.1 und codiert das insgesamt 629 AS lange Transmembranprotein (Parham et al. 2002).

Der IL-23R besteht aus einer 252 AS langen, zytoplasmatischen und einer einzelnen transmembranösen Domäne. Zwei extrazelluläre Cytokinrezeptordomänen, sowie eine N-terminale Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domäne bilden den extrazellulären Komplex. Der IL-23-Rezeptorkomplex besteht aus dem IL-23R und dem IL-12R $\beta$ 1, welche er sich mit dem IL-12 Rezeptorkomplex teilt (s. Abb. 1). Er wird von T-Helferzellen, NK-Zellen und Makrophagen, im geringeren Maße auch von dendritischen Zellen selbst exprimiert.

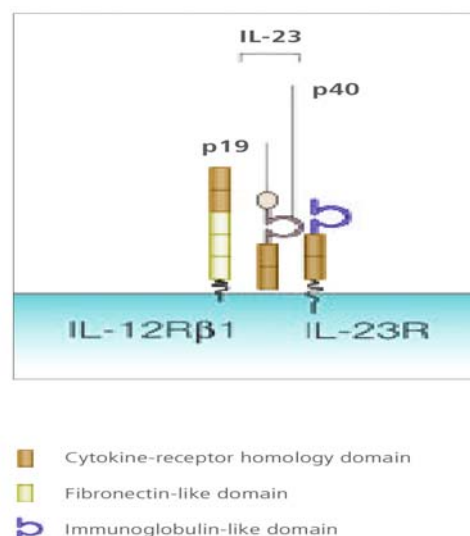


Abbildung 1: Aufbau des IL-23-Rezeptorkomplexes. Vergleiche Hunter et al. 2005.

Der Ligand des Rezeptors, Interleukin-23 ist ein heterodimeres Protein bestehend aus einer p19- und einer p40-Untereinheit, die über Disulfidbrücken verbunden sind. Werden Makrophagen oder DZs durch bakterielle Stimuli (Lipopolysaccharide (LPS) etc.) aktiviert, kommt es zur Ausschüttung von IL-23 (Oppmann et al. 2000, Weighardt et al. 2004). Die intrazelluläre Kaskade, welche durch die Bindung des Interleukins an den Rezeptorkomplex induziert wird, ist in Abbildung 2 beschrieben (Langrish et al. 2004).

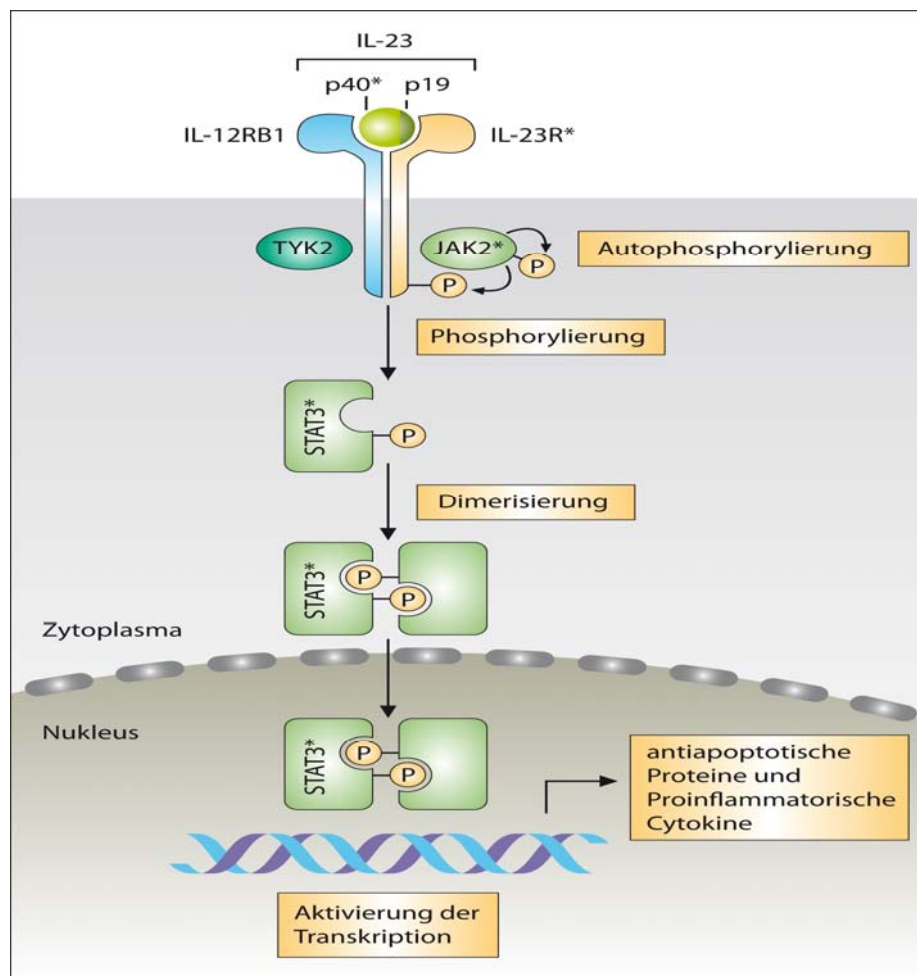


Abbildung 2: Signalweg des IL-23R. Vergleiche Cho al. 2008.

IL = Interleukin, p = Protein, R = Rezeptor, TYK = Tyrosinkinase, JAK = Januskinase, P = Phosphatrest, STAT= signal transducers and activators of transcription.

Nach Ligandenbindung kommt es zur Autophosphorylierung der JAKs und TYKs. Infolge dessen dimerisieren die STATS und können im Nucleus die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen induzieren.



Neben der beschriebenen Transkription von inflammatorischen Zytokinen bewirkt IL-23 die Differenzierung von naiven T-Zellen zu T<sub>17</sub> – Helferzellen (TH<sub>17</sub>, Aggarwal et al. 2003). Folge der Aktivierung von TH<sub>17</sub>-Zellen ist eine Schädigung des Gewebes, weshalb Interleukin-23 in der Pathogenese verschiedener Autoimmunerkrankungen diskutiert wird (Cua et al. 2003, Langrish et al. 2005, Hue et al. 2006, McGeachy et al. 2007).

Mit diesem Grundwissen ist es nachvollziehbar, dass Single Nukleotid Polymorphismen des Interleukin-23-Rezeptors diesen Signalweg in der Immunologie des Menschen modulieren und vielleicht sogar einen protektiven Einfluss auf den Schweregrad autoimmun-entzündlicher Krankheiten oder der GVHD haben könnten.

### 2.3.2 Aufbau und Wirkmechanismus des NOD2/CARD15-Rezeptors

Im Gegensatz zu dem IL-23-Rezeptorgen gelten Single Nukleotid Polymorphismen des NOD2/CARD15 als prognostisch ungünstige Faktoren (Hugot et al. 2001, Ogura et al. 2001).

Das CARD15-Gen codiert den zytoplasmatischen NOD2-Rezeptor, weshalb sich in der Literatur der Begriff NOD2/CARD15-Rezeptorgen durchgesetzt hat. Es befindet sich auf Chromosom 16 (16p12-q21) und besteht aus 3123 Nukleotiden, welche 1040 Aminosäuren kodieren. Der Rezeptor beinhaltet eine namensgebende Nukleotid-Oligomerisierungsdomäne (NOD), eine C-terminale, leucinreiche Domäne, sowie eine N-terminale Bindungsstelle (Ogura et al. 2001, Abb. 3).



Abbildung 3: Aufbau des NOD2/CARD15-Rezeptors. Vergleiche Kufer et al. 2006. In der Abbildung sind die Loci markiert, welche bei Trägern der einzelnen SNPs verändert sind (SNP 8-R702W, SNP 12-G908R, SNP 13-1007fs).

Der NOD2/CARD15-Rezeptor gehört zu den pattern recognition receptors (PRR) und ist damit Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Muramyl-Dipeptide (MDP), welche sich in Bakterienwänden befinden, werden durch die leucinreiche Domäne erkannt und induzieren eine intrazelluläre Kaskade, die schließlich zu einer Sekretion von NF- $\kappa$ B (engl. nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells) führt (Henckaerts et al. 2007).

Obwohl der Pathomechanismus noch nicht vollständig verstanden ist, weiß man, dass NF- $\kappa$ B eine wichtige Rolle bei der Ausreifung von B- und T-Lymphozyten spielt (Sen et al. 1986). Ein Verlust dieser Funktion hätte ein Überleben autoreaktiver T-Lymphozyten und die Entstehung von autoimmunen Erkrankungen zur Folge (Watanabe et al. 2004, Siebenlist et al. 2005).

Die Identifizierung von genetischen Eigenschaften ist für die Klärung der Ätiologie von verschiedenen Krankheiten bereits ein fester Bestandteil (u.a. Chorea Huntington, Morbus Bechterew). Mit der Erkennung von protektiven oder prädispositionierenden SNPs bestünde jedoch erstmalig die Möglichkeit, den Erfolg einer Therapie durch geeignete Auswahl von Spendern vor der HSZT zu beeinflussen.

### 3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Hauptkomplikation der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation, der graft-versus-host disease. Im Speziellen soll in dieser Promotionsarbeit erstmalig der Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer GVHD nach HSZT im Kindesalter und dem Tragen von Single Nukleotid Polymorphismen des Interleukin-23-Rezeptorgens und des NOD2/CARD15-Gens bei Spendern und Empfängern betrachtet werden.

Dafür wurde Material von 181 Spendern und 217 Empfängern, deren Transplantation im Zeitraum von 1982 bis 2007 an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Jena stattfand, bezüglich folgender Fragestellungen untersucht:

- 1) Wie häufig waren SNPs des IL-23-Rezeptorgens und NOD2/CARD15-Gens bei Empfängern und Spendern und bei wie vielen Patienten kam es zur Ausbildung einer akuten bzw. chronischen GVHD?
- 2) Gab es einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der GVHD und dem Nachweis eines Single Nukleotid Polymorphismus?
- 3) Korrelierten Manifestationsort der chronischen GVHD und das Vorliegen eines SNPs bei Empfänger bzw. Spender und gab es einen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten in Abhängigkeit eines SNPs?
- 4) Inwiefern beeinflussten Grunderkrankung und Alter der Patienten, Konditionierungsregime, GVHD-Prophylaxe und die Stammzellquelle die Inzidenz der akuten bzw. chronischen GVHD im Kindesalter?
- 5) Welche therapeutischen Möglichkeiten ergeben sich aus den Erkenntnissen dieser Arbeit?

## 4 Patienten, Materialien und Methoden

### 4.1 Patienten

Für diese Promotionsarbeit wurde Material von insgesamt 231 Spender–Empfänger-Paaren untersucht, deren Transplantation im Zeitraum von 1982 bis 2007 in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena stattfand.

Dabei lag das mediane Alter der Patienten bei 11 Jahren (0 bis 29 Jahre). Die 149 Jungen (64,5 %) und 82 Mädchen (35,5 %) litten an verschiedenen Grunderkrankungen (s. Abb. 4). Bei dem Großteil mit 100 Patienten (43,3 %) stellte eine akute lymphoblastische Leukämie/ Non-Hodgkin-Lymphom (ALL/NHL) die Indikation zur allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation dar. 53 Patienten (22,9 %) wurden mit der Diagnose akute myeloische Leukämie (AML) transplantiert, bei 26 Patienten (11,3 %) stand ein myelodysplastisches Syndrom (MDS) im Vordergrund. Bei 18 Patienten (7,8 %) fand sich als Grunderkrankung eine chronische myeloische Leukämie (CML), bei 14 Patienten (6,1 %) eine schwere aplastische Anämie (SAA). Bei 8 Patienten (3,5 %) lag eine Speicherkrankheit zugrunde und bei 3 Patienten (1,3 %) eine Osteopetrosis. Jeweils 2 Patienten (0,9 %) litten unter einer Blackfan-Diamond-Anämie, einer infantilen septischen Granulomatose bzw. einem schweren kombinierten Immundefekt. Zusätzlich wurden jeweils ein Patient (0,4 %) mit einem Wiskott-Aldrich-Syndrom, ein Patient mit angeborener Amegakaryozytose und ein Patient mit maligner Histiozytose in die Untersuchungen mit einbezogen.

Eine GVHD-Prophylaxe erhielten 148 Patienten (64,1 %) in Form einer kombinierten Methotrexat- und Cyclosporin A-Medikation. Bei 46 Kindern (19,9 %) erfolgte diese mit Cyclosporin A und bei 16 (6,9 %) mit Methotrexat allein. Keinerlei Prophylaxe wurde bei 21 Patienten (9,1 %) gegeben, da bei ihnen als Hochrisikopatienten der GVL-Effekt im Vordergrund stehen sollte.

Die Konditionierung erfolgte in allen Fällen myeloablativ. Die Therapie beinhaltete die Gabe von Chemotherapeutika, teilweise gekoppelt mit fraktionierter und Ganzkörperbestrahlung (s. Tab. 4).

Zur Transplantation wurden in 72,3 % (n = 167) der Fälle Knochenmark und in 27,7 % (n = 64) periphere Stammzellen verwendet. Diese stammten bei 101 Pati-

enten (43,7 %) von einem HLA-identischen Verwandten, bei 91 Patienten (39,4 %) von einem HLA-kompatiblen Fremdspender und bei 25 Patienten (10,8 %) von einem nicht-HLA-kompatiblen Fremdspender. Bei einem minimalen Prozentsatz musste auf haploidentisches Material zurückgegriffen werden (n = 14; 6,1 %).

Die 181 Spender waren zu 59,3 % (n = 137) männlich und zu 40,7 % weiblich (n = 94).

Die Einteilung der akuten und chronischen GVHD erfolgte nach den Standardkriterien (Przepiorka et al. 1995, Sullivan et al. 1991).

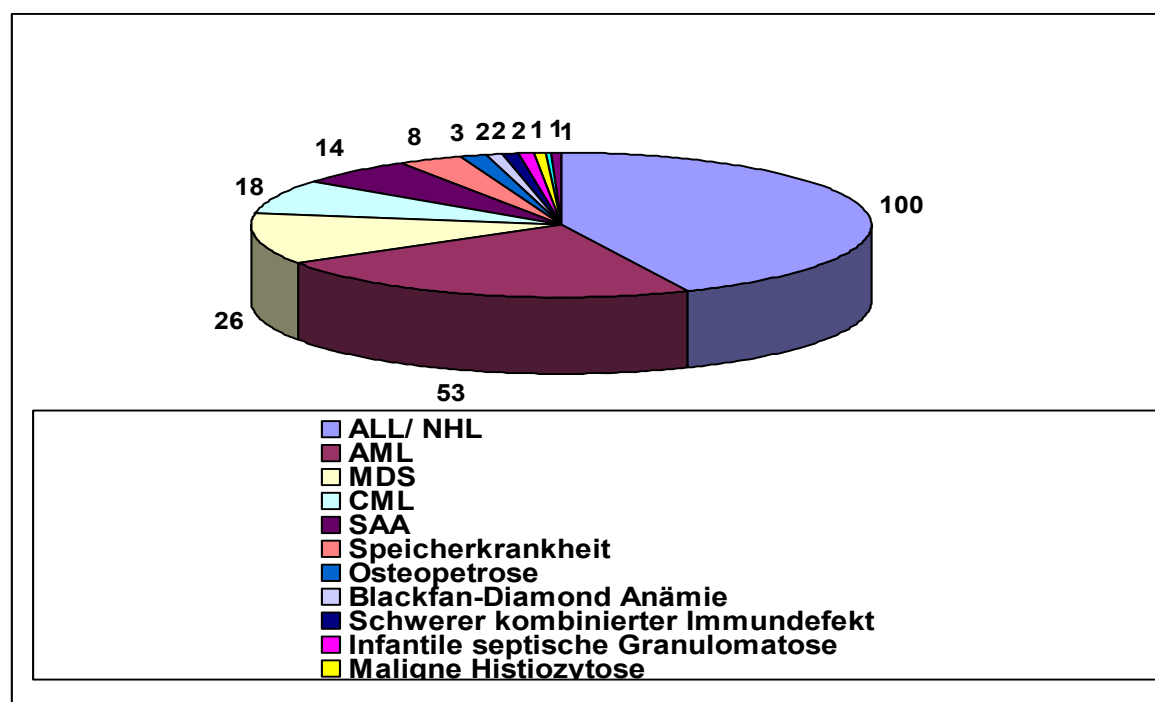


Abbildung 4: Grunderkrankungen der Patienten. ALL/ NHL = akute lymphoblastische Leukämie/ Non-Hodgkin Lymphom, MDS = myelodysplastisches Syndrom, SAA = schwere aplastische Anämie, AML = akute myeloische Leukämie, CML = chronische myeloische Leukämie.

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Patienten mit ihren Grunderkrankungen. Dabei steht bei dem Großteil der Patienten eine Leukämie als Diagnose im Vordergrund. Nur ein geringer Prozentsatz der Patienten musste aufgrund einer genetischen Grunderkrankung und seinen Folgen transplantiert werden.

Tabelle 4: Konditionierung der Patienten

Konditionierung	Patientenanzahl
BU CY MEL ALG	1
BU FLU ATG	1
BU TEPA FLU	1
BU VP16 TEPA ATG	1
BUFEX CY	1
CY TNI ARAC	1
CY FLU CAM	1
TBI VP16 TEPA	1
TBI CY ATG TEPA	1
TBI CY FLU ATG	1
TBI VP16 TEPA OKT3 PR	1
FTNI BU CY ATG	1
MEL FLU ATG	1
BU CY VP16	2
BU CY TEPA	2
BU MEL FLU ATG	2
CY FLU ATG	2
TBI CY ATG TEPA	2
TEPA FLU ATG	2
BU CY VP16 ATG	3
BU CY TEPA OKT3 PRED	3
CY ATG	3
BU CY TNI	4
CY TNI	4
TBI TEPA VP16 ATG	5
BU CY TEPA ATG	7
TBI CY VP16	7
TBI CY	7
BU CY ATG	8
BU CY VP16	8
BU CY MEL	10
TBI CY ATG	10
TBI CY	18
BU CY	21
BU CY MEL ATG	29
TBI VP16	29
TBI VP16 ATG	29

(F)TBI = (fraktionierte) Ganzkörperbestrahlung (engl. total body irradiation), TNI = totale nodale Bestrahlung (engl. total nodal irradiation), BU = Busulfan in mg/kg KG, CY = Cyclophosphamid in mg/kg KG, ATG = Antithymozytenglobulin, VP16 = Vepesid in mg/kg KG, Melphalan (Aikeran) in mg/m<sup>2</sup>, ARAC = Cytosin-Arabinosid in mg/m<sup>2</sup>, TEPA = Thiotepa in mg/m<sup>2</sup>, ALG = Antilymphozytenglobulin, OKT3 = Muromon ab-CD3, PRED = Prednisolon, FLU = Fludarabin, CAM = Campath.

## 4.2 Materialien

Zur Verfügung standen 217 Empfängerproben und 181 Probenmaterialien von Spendern.

Untersucht wurden vor der Transplantation in flüssigen Stickstoff kryokonserviertes Knochenmark oder peripheres Blut. Nach Möglichkeit wurde beim Fehlen von

prätransplantärem Material Mundschleimhaut vom Patienten bzw. Blut als Spendermaterial genutzt. Damit sollte eine möglichst hohe Anzahl an Probanden für diese Arbeit gewährleistet werden. Letztendlich gelangten somit 168 vollständige Empfänger- Spender-Paare zur Auswertung.

#### 4.2.1. Geräte und Reagenzien

Die verwendeten Geräte und Reagenzien sind in Tabelle 5 und 6 zusammengefasst.

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Geräte mit Hersteller.

Geräte	Hersteller
ABI Prism™ 7900 Sequence Detector	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf
Multizentrifuge 3s	Heraeus
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Ultrospec® III Photometer	Pharmacia Biotech
Quarzglasküvette	HELLMA
Pipetten, Multipipette	Eppendorf
50µl und 1,5ml Tubes	Eppendorf
Serum Pipette steril, PP-Tubes steril 15ml	Greiner Bio-One
Einmalpipettenspitzen	Eppendorf
Spritzen 10-20ml	Braun
Kanülen	Braun
Vortexer	Heidolph REAX 2000
96 Well Multititerplatte	Applied Biosystems
Reagenzlashalter etc.	
Thermocycler, PTC-200	MG Research, Watertown, USA
Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems

Tabelle 6: Zusammenstellung der verwendeten Reagenzien mit Hersteller.

Reagenz	Zusammensetzung	Hersteller
Binding Buffer	6 Mol (M) Guanidin-HCl	Roche
	10 mM Urea	
	10 mM Tris-HCl, 20%	
	Triton88 X-100 (v/v)	
	pH 4,4	
Proteinase K	90 mg Lyophilisat	Roche
Inhibitor Removal Buffer	5 M Guanidin-HCl	Roche
	20 mM Tris-HCl	
	pH 6,6 (mit Ethanol 1:1,65)	
Wash Buffer	20 mM NaCl	Roche
	2 mM Tris-HCl	
	pH 7,5 (mit Ethanol 4:1)	
Elution Buffer	10 mM Tris, pH 8,5.	Roche
PBS – Puffer 500 ml	4 g NaCl	Serag-Wiessner GmbH & Co. KG
	0,1 g KCl	
	0,125 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$	
	0,675 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	
	$\text{H}_2\text{O}$ für Injektionszwecke	
	pH 7,3	
Isopropanol 500 ml	99+%ig und $\text{H}_2\text{O} < 0,05 \%$	Sigma
RNAse free water		Quiagen GmbH Hilden
Aqua ad iniectabilia 10 ml		Braun
TaqMan® Genotyping Mastermix 50 ml		Applied Biosystems
TaqMan-Polymerase		Applied Biosystems
Primer-Sonden-Mix		Applied Biosystems

HCl = Chlorwasserstoffsäure,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  = Kaliumdihydrogenphosphat, mM = millimolar, NaCl = Natriumchlorid,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  = Dinatriumhydrogenphosphat, pH = pondus Hydrogenii, Tris = Trishydroxymethylaminomethan, v/v = volume in volume, Buffer = engl., Puffer

## 4.3 Methoden

### 4.3.1 DNA – Extraktion

Die DNA musste zunächst aus den verschiedenen Proben isoliert werden. Dafür wurde für die Gewinnung aus Knochenmark und peripheres Blut das High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet.



#### **4.3.1.1 Vorbereitung**

Durch konsequente Arbeitsplatzhygiene, das Tragen von Einmalhandschuhen und Schutzbekleidung sollte einer Kontamination der Proben vorgebeugt werden. So erfolgte vor und nach jeder Benutzung die Reinigung der verwendeten Geräte und des Arbeitsplatzes mit einem antimikrobiellen Reinigungsmittel (Descosept AF). Für die einzelnen Arbeitsschritte wurden verschiedene Pipettenspitzen verwendet. Ebenfalls beugte man einer Verunreinigung durch Arbeiten in verschiedenen Räumen mit separaten Pipetten vor.

Die Entnahme der Proben aus den Containern mit flüssigem Stickstoff musste zudem sorgfältig dokumentiert und die Proben bis zur Verwendung auf Eis gelagert werden. Unentbehrlich für die Auswertung der Ergebnisse war außerdem die erneute Kontrolle des Datums der Probe, welche beim Patienten vor der KMT liegen musste bzw. vor der ersten KMT.

#### **4.3.1.2 Durchführung**

Nachdem die Probe im warmen Wasser aufgetaut worden war, erfolgte die Überführung in ein 15 ml Tube. Dieses wurde bis zur oberen Markierung mit PBS-Puffer befüllt und fünf Minuten (min) bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) zentrifugiert.

Anschließend erfolgten ein vorsichtiges Dekantieren des Überstandes und die Zugabe von 200 µl PBS-Puffer zum Zellpallet. Das ganze wurde mit der Pipette suspendiert und in ein leeres 1,5 ml Tube gegeben. Für die Zelllyse wurden nun 40 µl Proteinase K und 200 µl Binding Puffer hinzugefügt, circa 30 Sekunden (sec) zur Resuspendierung „gevortext“ und anschließend 10 min in das auf 72 °C vorgewärmte Wasserbad gegeben.

Die Fällung der DNA erfolgte mit 100 µl Isopropanol und wiederholtem „Vortexen“. Der komplette Inhalt wurde auf in ein High Pure Filter Tube pipettiert, welches einem Collection Tube (engl., Sammelröhrchen) aufgesetzt worden war und eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Unterstand wurde verworfen und das Filter Tube auf ein neues Collection Tube gesetzt.

Nach Zugabe von 500 µl Inhibitor Removal Puffer erfolgte ein weiterer einminütiger Zentrifugenlauf bei 8000 rpm.

Es folgten anschließend zwei Waschvorgänge mit jeweils 500 µl Waschpuffer und einminütiger Zentrifugation bei 8000 rpm. Nach dem ersten Durchlauf wurde das Filter Tube auf ein neues Collection Tube gesetzt. Das Collection Tube wurde nun jedoch nicht gleich verworfen, sondern der Filter Tube noch einmal 10 sec bei 14000 rpm „trocken zentrifugiert“.

Im letzten Schritt wurde die Säule auf ein zuvor mit Namen, Datum, Probandatum und Probenmaterial beschriftetes 1,5ml, steriles Tube gesetzt und abschließend 100 µl Elutionspuffer hinzu pipettiert. Nach dreiminütiger Inkubationszeit und einminütiger Zentrifugation bei 8000 rpm konnte das Filter Tube verworfen werden und die gewonnene DNA bei 4 °C aufbewahrt werden.

Bei 12 Patienten gewannen wir Zellmaterial aus der Mundschleimhaut, da kein kryokonserviertes Material zur Verfügung stand. Die Extraktion der DNA erfolgte in diesem Fall mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kits der Firma Quiagen, Hilden nach Angaben des Herstellers.

#### **4.3.1.3 Konzentrationsmessung**

Ziel für die anschließende Real-Time PCR sollte es sein, eine Probe mit einem DNA-Gehalt von 10 ng/µl herzustellen. Dafür musste zunächst einmal die DNA-Konzentration des gewonnenen Eluats photometrisch bestimmt werden.

Es wurde eine 1:20 Lösung erstellt, um möglichst sparsam mit der gewonnenen DNA umzugehen. 76 µl RNase freies Wasser und 4 µl DNA wurden in einem 1,5 ml Tube sorgfältig gevortext und kurz abzentrifugiert.

Nach der Eichung des Photometers mit 80 µl RNase freiem Wasser konnte die DNA - Lösung luftblasenfrei in die Küvette pipettiert werden. Anschließend erfolgte die Messung der Lösung bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm, deren Ratio und der DNA-Konzentration.

Um zu verifizieren, dass es sich bei den gemessenen Angaben auch wirklich um DNA handelte, sollten die Werte für die Ratio idealerweise zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

Lagen die mit Faktor 20 multiplizierten DNA-Konzentrationen der Lösung nicht exakt bei 10 ng/µl, musste eine neue Lösung hergestellt werden.

## **4.3.2 Real-Time PCR**

### **4.3.2.1 Prinzip der Methode**

1992 gelang Higuchi et al. die Weiterentwicklung der nobelpreisprämierten PCR-Methode von Kary Mullis aus den Achtziger Jahren (Saiki R.K. et al. 1985, Higuchi R. et al. 1992). Erfolgte bis dato die Quantifizierung der vervielfältigten DNA nach jeder PCR mittels einer kontaminationsanfälligen Gelaufftrennung, konnte diese nun ganz einfach durch Fluoreszenzmessung nach jedem einzelnen Zyklus (in Echtzeit, engl. real time) und der Auswertung durch Hersteller individualisierte Software ersetzt werden (Kubista et al. 2006).

Grundsätzlich blieb hierfür das Prinzip der einzelnen PCR-Zyklen erhalten. An eine initiale Phase der Denaturierung der DNA bei 94-96 °C schließt sich die Anlagerung der Primer an die nun einzelsträngig vorliegende DNA (Annealing, bei ca. 50°C) an. Mit Hilfe der hitzebeständigen Taq-Polymerase (vom Bakterium *Thermus aquaticus*) werden im dritten Schritt die freien Nukleotide entsprechend der komplementären Basenpaarung bei einer Temperatur von 72 °C eingebaut (Elongation, Extension).

Am Ende der Elongationsphase erfolgt die Detektierung des Fluoreszenzfarbstoffes, der parallel zur DNA-Konzentration ansteigt. Dafür befinden sich im Primer-Sonden-Gemisch so genannte „TaqMan®-Probes“. Dies sind Oligonukleotide, an denen am 5'-Ende ein Reporterfarbstoff und am 3'-Ende ein Quencherfarbstoff gebunden ist (s. Abb. 5). Die Emissionsenergie des Reporters wird solange vom Quencherfarbstoff unterdrückt, bis die TaqMan®-Probe mit dem Amplifikat mittels Taq-Polymerase hybridisiert (s. Abb. 6, Förster et al. 1948). Dabei erfolgt aufgrund der Exonukleaseaktivität der Polymerase die Abspaltung der Farbstoffe und durch Verlust ihrer räumlichen Nähe kann nun die emittierte Energie des Reporters detektiert werden. Da die TaqMan®-Probe am 3'-Ende geblockt ist, bricht die Amplifikation ab. Bei zunehmender Zykluszahl steigt die Anzahl freier Reportermoleküle, was grafisch extern dargestellt werden kann (s. Abb. 7).

Eine erhöhte Bindungsspezifität der TaqMan®-Probe wird durch den minor groove binder (mgb) erzielt. Er befindet sich am Quencherfarbstoff und erhöht die Denaturierungstemperatur. Dadurch kann die TaqMan®-Probe kürzer und somit spezifischer sein.

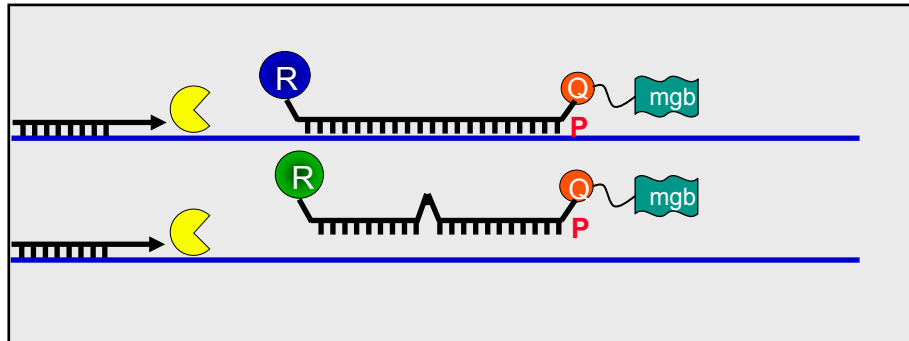


Abbildung 5: Prinzip der Amplifikation während der Real-Time PCR. Vgl. *Applied Biosystems*, P = Primer, Q = Quencher, R = Reporter, mgb = minor groove binder  
Die gelb dargestellte Polymerase verlängert die zwei Einzelstränge mittels freier Nukleotide zu zwei neuen Doppelsträngen. Dabei erfolgt auch der Einbau der TaqMan®-Probe.

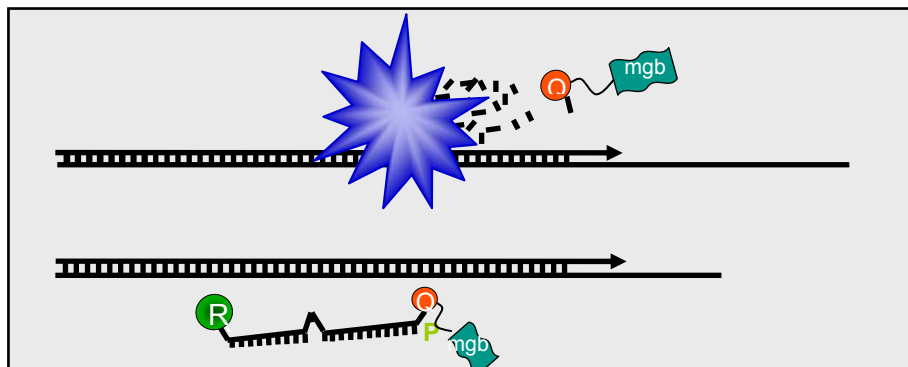


Abbildung 6: Prinzip des Einbaus der TaqMan®-Probe während der Real-Time PCR. Vgl. *Applied Biosystems*, P = Primer, Q = Quencher, R = Reporter, mgb = minor groove binder.

Die TaqMan® Probe hybridisiert mit dem komplementären Einzelstrang. Durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase kommt es zur Abspaltung der Farbstoffe und zur Emission der Energie des Reportermoleküls.

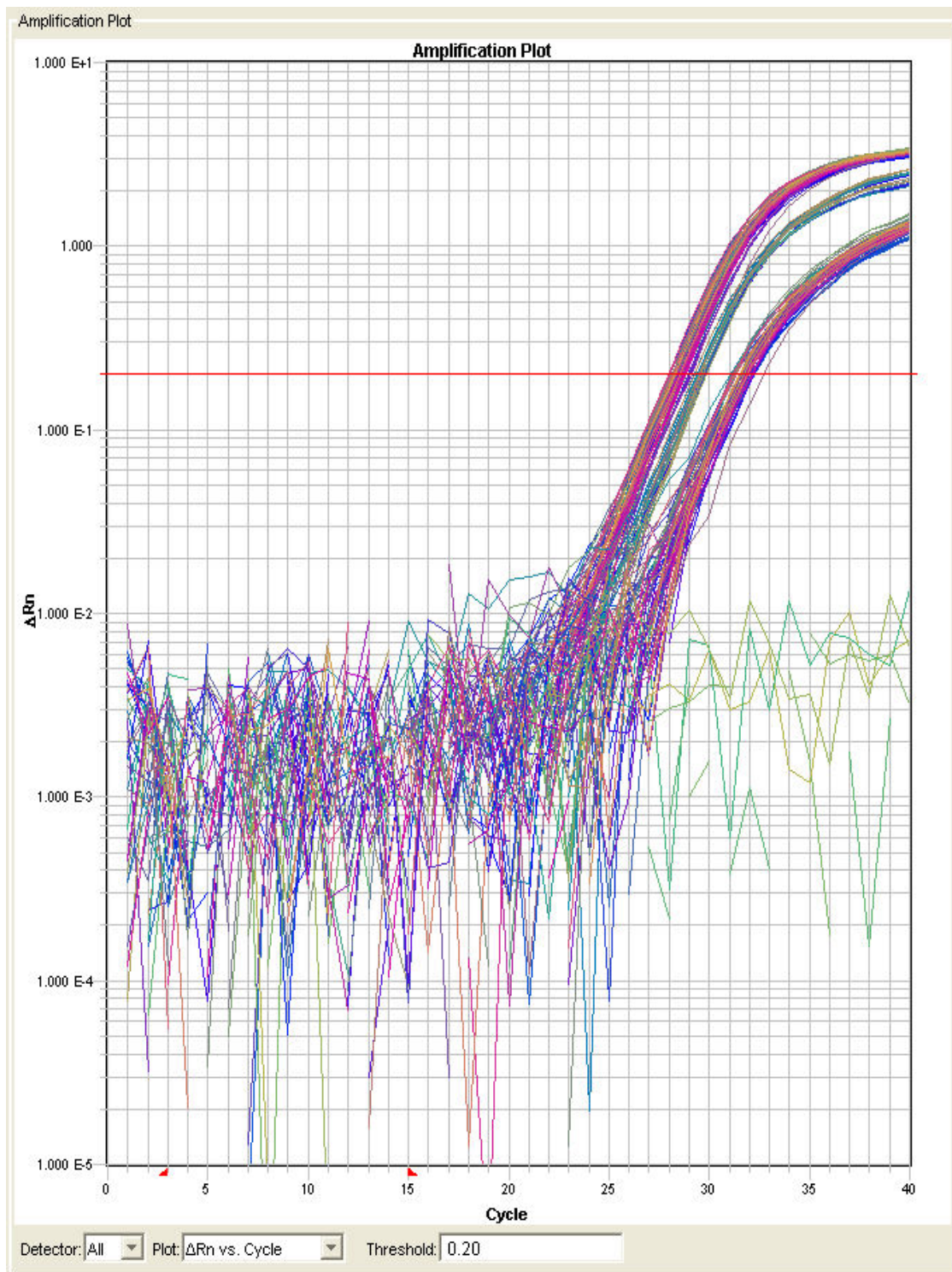


Abbildung 7: Externe Darstellung der Detektion freier Reportermoleküle (aus der Genotyping Software von Applied Biosystems).

Die y-Achse stellt die Emissionsintensität ( $\delta Rn$ ) der Reportermoleküle in Abhängigkeit von der in der X-Achse aufgetragenen Zykluszahl dar. Mit zunehmender Zykluszahl steigt die Anzahl freier Reportermoleküle exponentiell an, was sich in einer steigenden Emissionsintensität niederschlägt. Keinen Anstieg verzeichnen die Negativkontrollen (NTCs).

Neben der Quantifizierung von RNA als Nachweismethode verschiedener Erreger und der qualitativen DNA-Bestimmung wie beispielsweise bei Vaterschaftstests als Anwendungsbereiche der Real-Time PCR, befasste sich diese Arbeit mit der Möglichkeit der allelischen Diskriminierung von SNPs.

#### **4.3.2.2 Vorbereitung**

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der SNPs des IL-23-Rezeptorgens und des NOD2-CARD15-Gens untersucht werden.

Zunächst wurden in der mitgelieferten Sequence Detection Software (SDS) von Applied Biosystems die zu untersuchenden Probennummern eingegeben und auch die als Negativkontrolle (NTC, engl. no template control) geplanten Proben auf der virtuellen 96-Well-Multititerplatte markiert. Beim Setup der Software wurde ebenfalls der Reporterfarbstoff für das jeweilige Allel definiert. VIC galt als Reporter für Allel 1 (z. B. beim IL-23R-SNP für Guanin – Adenin, also Heterozygotie) und FAM als Reporter für Allel 2.

Bei der Vorbereitung der PCR galt es wieder jegliche Kontamination der DNA oder der PCR-Proben zu vermeiden. Dies wurde zum einen durch das Arbeiten in verschiedenen Räumen, durch Tragen von Einmalhandschuhen und Schutzkleidung, sowie durch gründliches Reinigen der Arbeitsflächen und ein vorsichtiger Umgang mit allen Proben und Reagenzien gewährleistet. Die DNA-Proben wurden während der gesamten Arbeitszeit auf Eis gelagert.

Essentiell für die spätere Auswertung war auch die Beschriftung der Tubes mit der passenden Probennummer und die Anordnung auf den Reagenzglashalter, wie sie später auch auf die 96-Well Platte pipettiert werden sollten, um so ergebnisverfälschende Verwechslungen zu vermeiden.

#### **4.3.2.3 Durchführung**

Die bereits isolierte, bei -20 °C gelagerte DNA wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend sorgfältig gevortext.

Gleichzeitig wurden je Probe für die Einfachbestimmung 20 µl dieser Lösung in 50 µl Tubes zusammengegeben:

- 10 µl Genotyping Mastermix
- 9,5 µl H<sub>2</sub>O
- 0,5 µl Primer-Sonden Mix

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Primer.

Gen	Primer	Sequenz
IL-23R	Primer F	AATGAAGACTAATGCTTGG
	Primer R	TGTAGAGAGTTTGGCATGG
NOD2/CARD15	Primer F	GTCCAATAACTGCATCACCTACCT
	Primer R	ACTTCCAGGATGGTGTCTTCC

A = Adenin, C = Cytosin, F = forward (engl., vorwärts), G = Guanin, T = Thymin, R = reverse (engl., rückwärts).

Für die zu untersuchenden Positionen der SNPs konnten „ready to use“-Primer-Sonden-Gemische fertig zusammengestellt bei Applied Biosystems mit folgenden IDs (Identitäten, engl. identities) bestellt werden (s. Tabelle 8, [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)):

Tabelle 8: SNP-IDs der zu untersuchenden Positionen.

Genlocus	SNP-ID	Probennummer
IL-23R-1142 G>A	rs11209026	C_1272298_10
NOD2/CARD15 (SNP8)	rs2066844	C_11717468_20
NOD2/CARD15 (SNP12)	rs2066845	C_11717466_20
NOD2/CARD15 (SNP13)	rs2066847	nicht verfügbar

A = Adenin, G = Guanin, ID = Identity, rs = reference SNP ID

Lediglich für den SNP 13 des NOD2/CARD15-Gens gab es keine fertige Zusammenstellung, weshalb der Hersteller auf Anfrage einen Primer-Sonden-Mix mit folgenden Sequenzen generierte (s. Tabelle 9):

Tabelle 9: Primer-Sonden-Mix für SNP 13 (NOD2/CARD15).

Gen	Bestandteil	Sequenz
SNP13	Primer F, 900 nM	GTCCAATAACTGCATCACCTACCT
	Primer R, 900 nM	ACTTCCAGGATGGTGTTCATTCC
(NOD2/CARD15)	Probe 1, 200 nM (FAM-Reporter)	CTGCAGGCCCTTGA MGB
	Probe 2, 200 nM (VIC-Reporter)	CTGCAGGCCCTTGA MGB

A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin, MGB = minor groove binder, nM = Nanomol

Nachdem die 20 µl in alle Tubes pipettiert worden waren, erfolgte die Zugabe von jeweils 1 µl DNA. Anschließend wurde der gesamte Mix noch einmal gut gevortext und auf die Platte pipettiert. Die Öffnung der Platte wurde luftblasenfrei mit einer Folie verschlossen und in den ABI Prism™ 7900 Sequence Detector gegeben.

Es erfolgte die Real-Time PCR mit 40 Zyklen bei folgenden Grundeinstellungen gemäß den Angaben des Herstellers:

- 1) 10 min bei 95 °C
- 2) 15 sec bei 92 °C (Denaturierung)
- 3) 1min bei 60 °C (Annealing, Extension)

Nach Abschluss des Durchlaufs erfolgte der „post read“, sprich die Auswertung der Detektierung mittels des SDS. Dabei gab es zwei Darstellungsmöglichkeiten des Herstellers, um die Proben auszuwerten. Zum einen wie in Abbildung 7 bereits beschrieben oder aber durch die direkte Zuordnung der Probe zu Allel 1 oder 2 (s. Abb. 8).



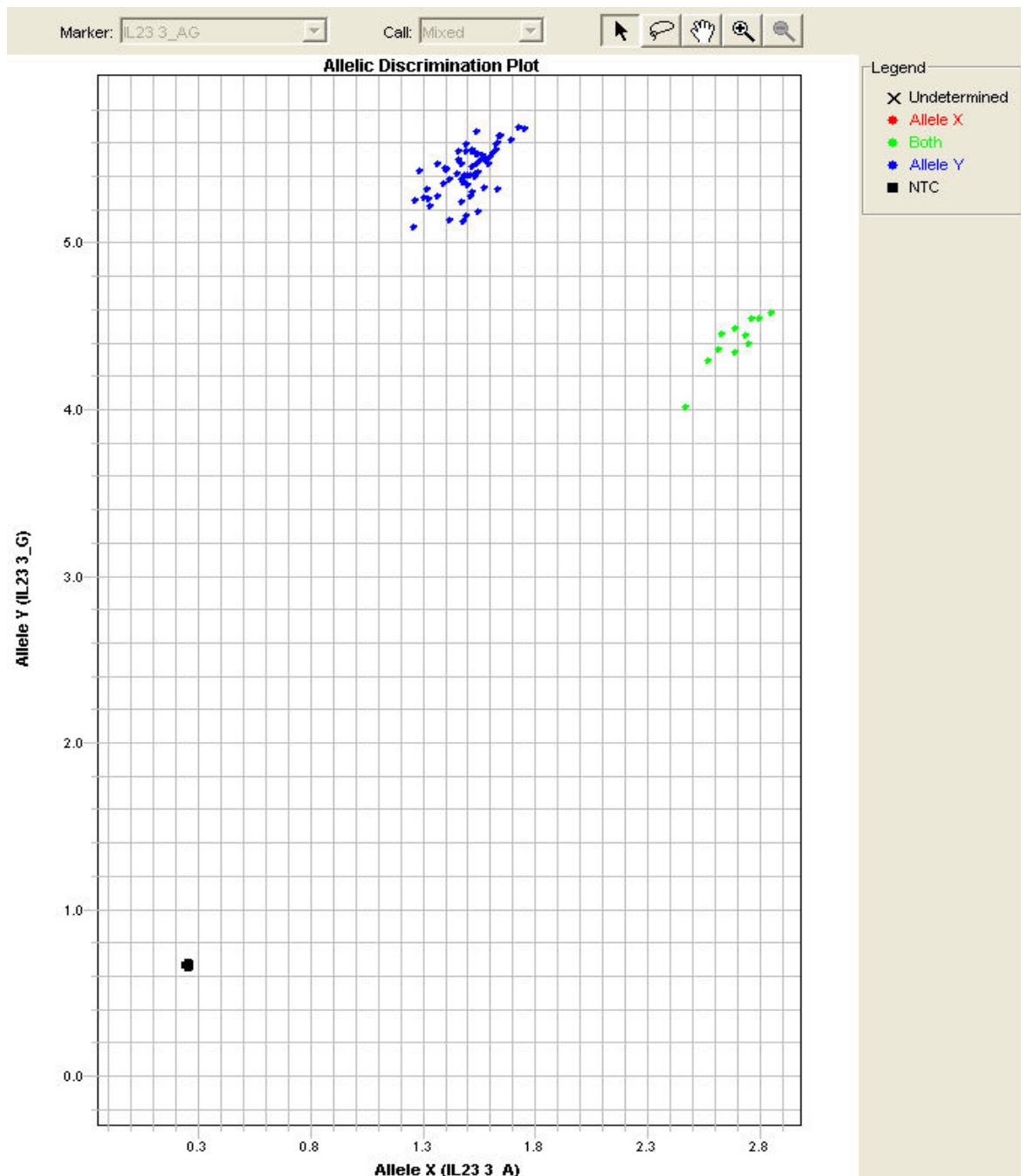


Abbildung 8: Externe Darstellung der Ergebnisse der Allelischen Diskriminierung. Abbildung aus Genotyping Software von *Applied Biosystems*.

Die Grafik erlaubt eine Zuordnung der Markierungen abhängig von ihrer Position. Liegen sie, wie die schwarz markierten NTCs, fast linear im Bereich mit niedrig intensiven Emissionsenergien, konnte keine Detektierung von DNA und entsprechende Diskriminierung mit farblicher Zuordnung erfolgen. Blaue Markierungen konnten dem Allel Y (bzw. der homzygoten Variante) zugeordnet werden, während bei den grünen Markierungen beide (both) Allele detektiert werden konnten (heterozygot).

### **4.3.3 DNA-Sequenzierung**

#### **4.3.3.1 Prinzip der Methode**

Das Prinzip der Didesoxymethode oder Kettenabbruchsynthese verhalf Frederick Sanger 1980 zu seinem zweiten Nobelpreis in der Chemie und der Wissenschaft zur Entschlüsselung des menschlichen Genoms. In dieser Arbeit sollten mit dieser Methode stichprobenartig die Ergebnisse von vorher allelisch diskriminiertem Patientenmaterial der Real-Time PCR verifiziert werden.

Prinzipiell erfolgt die Amplifikation der DNA wie bei einer PCR. Nach der Denaturierung der DNA-Doppelhelix und dem Vorliegen zweier Einzelstränge erfolgt bei dieser Methode jedoch neben dem Einbau eines Primers und der linearen Verlängerung mittels Polymerase nun der Einbau von Didesoxynucleosidtriphosphaten (ddNTP). Durch das Fehlen der 3'-Hydroxylgruppe am C-Atom kann keine Ausbildung der Phosphodiesterbildung mit dem Amplifikat stattfinden und die DNA-Synthese bricht an dieser Stelle ab. Das Ganze geschieht in vier separaten Ansätzen mit dem gleichen Primer und dem jeweiligen ddNTP(ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP), welches mit einem Fluorophor markiert ist. Entsprechend der Sequenzabfolge entstehen Amplifikate unterschiedlicher Länge und Laufzeit im Agarosegel. Die fluoreszenzmarkierten ddNTPs werden anschließend durch einen computer-gestützten Laser angeregt (Sanger et al. 1977). Mittels Herstellersoftware kann das Ergebnis grafisch dargestellt und ausgewertet werden.

#### **4.3.3.2 Vorbereitung**

Wie in den vorangegangenen Arbeitsschritten sollte mit den bereits beschriebenen Hygienemaßnahmen eine Kontamination der DNA und daraus resultierende Ergebnisverfälschungen vermieden werden.

#### 4.3.3.3 Durchführung

Es erfolgte die Sequenzierung von vier bereits zuvor durch TaqMan® Real-Time PCR typisierten DNA-Proben. Dazu wurden die gleichen Primer wie für die allelische Diskriminierung verwendet (s. Tabelle 7).

Die Ansätze in den 50 µl Tubes enthielten:

- 500 ng DNA
- 1,25 Units TaqMan® DNA Polymerase
- 200 µmol/l ddNTP
- 0,5 µmol/l von jedem Primer
- 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,8).

Nach einer initialen 5 minütigen Denaturierung bei 94 °C erfolgte die PCR im Pel-tier Thermocycler für 40 Zyklen nach folgendem Reaktionsmuster:

- 1) 1 min Denaturierung bei 94 °C
- 2) 1 min Annealing bei 55 °C
- 3) 1 min Extension bei 72 °C.

Schlussendlich wurden die Aliquots (10 µl) der PCR nach einer zehn minütigen Elongationsphase auf ein 2 %-iges Agarosegel aufgetragen und mit 0,05 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt.

Unter UV-Licht konnte anschließend die gefärbte Bande ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers extrahiert werden. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des Prism 310 Genetic Analyzer von Applied Biosystems nach der oben beschriebenen Methode.

#### 4.3.4 Statistische Auswertung

Das Erheben und die Auswertung der Daten erfolgte mit der Unterstützung des Instituts für Medizinische Dokumentation der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena.

Bei der Frage nach einem Zusammenhang zwischen den Polymorphismen und dem Auftreten einer akuten GVHD wurde der Korrelationskoeffizienten nach Spearman bestimmt (Spearman et al. 1904). Aufgrund der kleinen Probandenzahlen erfolgte der Vergleich der Gruppen mit Grad 0 bzw. I und Grad II – IV einer GVHD mit Hilfe des Exakten Tests nach Fisher (Sonderform des Chi<sup>2</sup>-Tests; Fis-

her et al. 1925). Die Berechnung des Einflusses auf ereignisfreies Überleben und das Überleben insgesamt wurden mit Hilfe von Kaplan-Meier berechnet und dargestellt (Kaplan et al. 1958). Das Signifikanzniveau wurde auf  $p = 0,05$  limitiert. Für die statistische Auswertung wurde das Programm SPSS 15.0 verwendet. Die grafischen Darstellungen dieser Arbeit wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel, Microsoft Office Word 2007 und Adobe Photoshop erstellt. Die Literaturverwaltung erfolgte mit der Software Citavi.

## **5 Ergebnisse**

Von 231 Spender-Empfänger-Paaren konnten mit 217 Empfängerproben und 181 Spenderproben 168 komplette Paare zur Auswertung gebracht werden. Die Frequenz der SNPs entsprach den Ergebnissen aus früheren Veröffentlichungen (Elmaagacli et al. 2006 und 2008, Sairafi et al. 2008, Mayor et al. 2007, Madrigal et al. 2008, Holler et al. 2004, 2006 und 2008).

### **5.1 Häufigkeit der Single Nukleotide Polymorphismen**

Die IL-23R-1142G>A-Variante fand sich bei 17 Empfängern (7,8 %) und 20 Spendern (11 %). Dem gegenüber standen 200 Empfänger (92,2 %) und 161 Spender (89 %) mit dem Wildtyp. Kein Empfänger oder Spender war homozygot für das Allel. Fünfmal ergab sich die Konstellation, dass bei dem Empfänger-Spender-Paar beide Träger des IL-23R-Genpolymorphismus waren. .

Bei der Untersuchung des NOD2/CARD15-Polymorphismus wurde der SNP 8 bei 16 Patienten (7,4 %) und 16 Spendern (8,8 %) nachgewiesen, wobei ein Patient homozygot für das Allel war. Der SNP 12 hingegen konnte lediglich bei 5 Patienten (2,3 %) und 8 der Spender (4,4 %) detektiert werden. Kein Patient oder Spender war homozygoter Merkmalsträger. Mit 21 Patienten (9,6 %) fand sich SNP 13 am häufigsten, wovon ein Patient homozygoter Merkmalsträger war. 12 Spender (6,6 %) waren ebenfalls Träger des SNP 13.

### **5.2 GVHD**

#### **5.2.1 Häufigkeit**

107 Patienten (46 %) entwickelten nach der Transplantation innerhalb von 100 Tagen eine akute GVHD. Dabei manifestierte sich die Krankheit bei einem Großteil mit 82 Patienten (76,6 %) an der Haut. Zusätzlich fanden sich auch bei 50 Kindern (49 %) eine Beteiligung des Magen-Darm-Trakts und bei 33 eine Organmanifestation der GVHD an der Leber (32,4 %).

Bei 22 % der Patienten (n = 51) wurde eine chronische GVHD dokumentiert. Am häufigsten waren davon Haut (n = 33), Mundschleimhaut (n = 23), Leber (n = 21), Magen-Darm-Trakt (n = 19) und die Lunge (n = 9) betroffen. Bei 15 Patienten wurde ein Sicca-Syndrom mit Xerophthalmie dokumentiert.

## **5.2.2 Der Einfluss von Single Nukleotid Polymorphismen auf die akute GVHD**

### **5.2.2.1 Bedeutung des IL-23R-SNPs beim Spender**

Interessanterweise fand sich ein signifikant geringeres Auftreten von akuter GVHD bei Patienten, deren Spender Träger des SNP für das IL-23R-Gen waren (Spearman's Korrelationskoeffizient  $p = 0,024$ ). Abbildung 9 verdeutlicht diesen Unterschied hinsichtlich der Schweregradausbildung der akuten GVHD.

### Prozent der Patienten

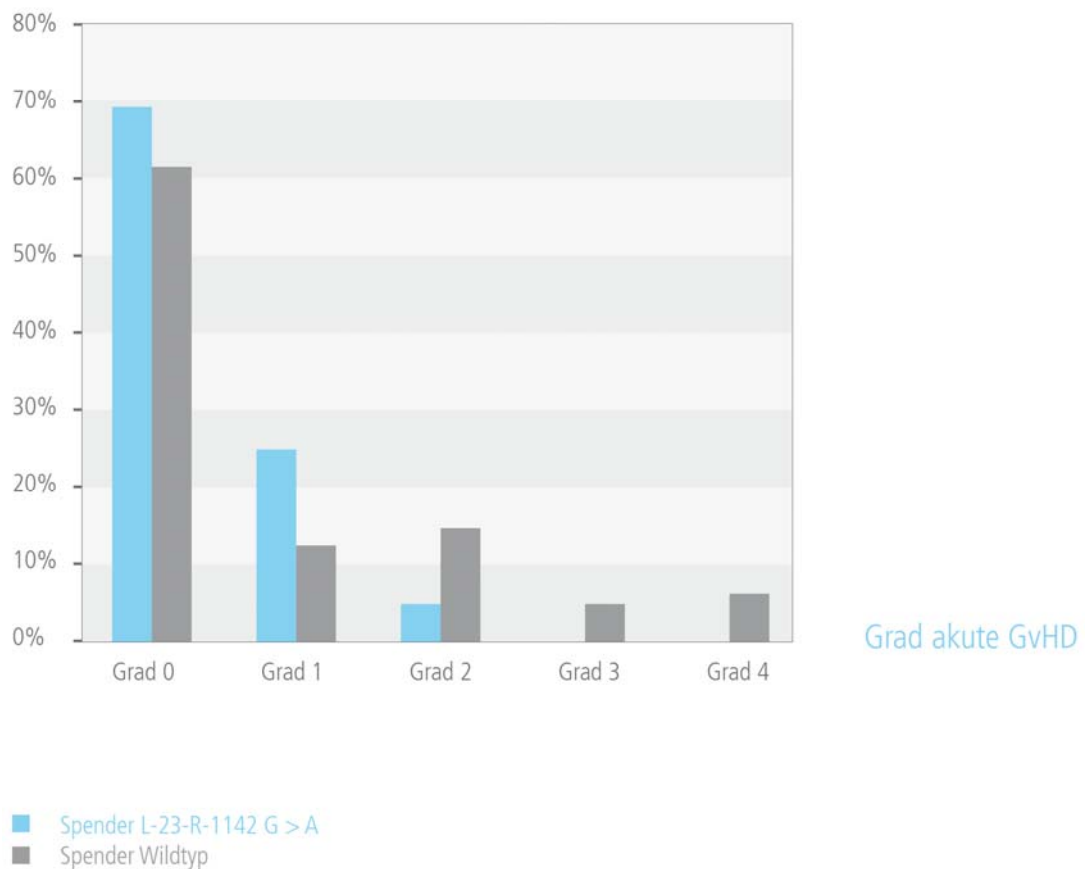


Abbildung 9: Akute GVHD bei Spendern mit IL-23R-1142G>A und Wildtyp.

IL-23R-1142G>A = Austausch von Arginin durch Glutamin beim Interleukin-23-Rezeptorgen.

Hellblau ist die Patientengruppe dargestellt, bei denen der Nachweis der IL-23R-1142G>A-Variante beim Spender erfolgen konnte. Im Vergleich dazu ist die Patientengruppe mit einem Spender ohne SNP für das IL-23-Rezeptorgen grau markiert.

Kinder, bei deren Spender ein IL-23R-SNP im Genotyp detektiert werden konnte, zeigten einen deutlich geringeren, prozentualen Anteil an der Ausbildung einer GVHD, sowie keinerlei nachweisbare Schweregrade 3 und 4.

Wie in vorangegangenen Studien wurde in Tabelle 10 speziell der Unterschied zwischen der Häufigkeit einer akuten GVHD Grad II- IV bei Patienten mit Spendern, die Träger des SNPs oder des Wildtyps sind, dargestellt (Elmaagacli et al. 2008).

Tabelle 10: Ergebnisse des exakten Tests nach Fisher: Häufigkeit des Auftretens einer akuten GVHD II-IV° im Zusammenhang mit dem Vorhandensein der vier verschiedenen Single Nukleotid Polymorphismen im Genotyp bei Spender und Empfänger.

Spender Genotyp		GvHD Grad II-IV		Fishers Exakter Test
		ja	nein	p-Wert
IL23R 1142G>A	ja	1	19	0,009
	nein	53	108	
	(Wt)			
NOD2/CARD15 SNP8	ja	5	11	1,0
	nein	49	116	
	(Wt)			
NOD2/CARD15 SNP12	ja	3	5	0,7
	nein	51	122	
	(Wt)			
NOD2/CARD15 SNP13	ja	3	9	1,0
	nein	1	19	
	(Wt)			
NOD2/CARD15 SNP Allgemein	ja	10	23	1,0
	nein	1	19	
	(Wt)			

Empfänger Genotyp		GvHD Grad II-IV		Fishers Exakter Test
		ja	nein	p-Wert
IL23R 1142G>A	ja	3	14	0,24
	nein	58	142	
	(Wt)			
NOD2/CARD15 SNP8	ja	3	13	0,56
	nein	58	143	
	(Wt)			
NOD2/CARD15 SNP12	ja	1	4	1,0
	nein	60	152	
	(Wt)			
NOD2/CARD15 SNP13	ja	7	14	0,71
	nein	54	142	
	(Wt)			
NOD2/CARD15 SNP Allgemein	ja	11	30	1,0
	nein	50	126	
	(Wt)			

Wt = Wildtyp.



Lediglich ein Patient (5 %), bei dessen Spender eine IL-23R-1142G>A-Variante nachgewiesen werden konnte, entwickelte eine akute GVHD zweiten Grades. Demgegenüber standen 53 von 161 Patienten (33 %), die eine akute GVHD Grad II bis IV entwickelten und von einem Spender ohne SNP transplantiert worden waren (Exakter Test nach Fisher  $p = 0,009$ ).

Um ausschließen zu können, dass dieses Ergebnis in den beiden Patientengruppen von anderen Charakteristika bedingt war, erfolgte der Vergleich von Empfänger und Spender mit der IL-23R-1142G>A-Variante auf ihre Haupteigenschaften wie Alter, Geschlecht, Grunderkrankung, GVHD-Prophylaxe etc. in Tabelle 11. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Tabelle 11: Vergleich der Spender mit Wildtyp und IL-23R-1142G>A-Variante

IL-23-R-1142G>A-Spender					
		Ja		Nein (Wt)	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
		20	100	161	100
Patientencharakteristik					
Geschlecht	männlich	12	60	102	63
	weiblich	8	40	59	37
Altersdurchschnitt (min-max)		12 (3-19)		10 (0-26)	
GVHD-Prophylaxe	MTX + CSA	11	55	104	65
	CSA	8	40	38	24
	keine Prophylaxe	1	5	19	12
Grunderkrankung	AML	3	15	37	23
	ALL/NHL	11	55	68	42
	MDS	4	20	22	14
	CML	1	5	11	7
	SAA	0	0	10	6
	Andere	1	5	13	8
Spendercharakteristik					
Geschlecht	männlich	11	55	98	61
	weiblich	9	45	63	39
Histokompatibilität	identisch-verwandt	5	25	56	35
	identischer Fremdspender	11	55	74	46
	Nicht-identisch	3	15	20	12
	Haploidentisch	1	5	11	7
Spendermaterial	Knochenmark	13	65	105	65
	PBSZ	7	35	56	35

CSA = Cyclosporin A, MTX = Methotrexat, PBSZ = periphere Blutstammzellen

### **5.2.2.2 Bedeutung des IL-23R-SNPs beim Empfänger**

Bei der Betrachtung der Patienten bzw. der Empfänger konnte kein signifikanter Anstieg der akuten GVHD bei Trägern des Wildtyps nachgewiesen werden. 3 von 17 Patienten (18 %), bei denen sich in der Real-Time PCR ein SNP fand, erkrankten an Grad II-IV. Prozentual geringfügig mehr Empfänger (58 von 200, 29 %), die keine IL-23R-1142G>A-Variante aufwiesen, zeigten Symptome einer zweit – bis viertgradigen akuten GVHD (Exakter Test nach Fisher,  $p = 0,24$ ).

Als bemerkenswert stellte sich bei Betrachtung des IL-23R-Polymorphismus noch heraus, dass bei 5 Empfänger-Spender-Paaren, bei denen sowohl Spender als auch Empfänger Träger des SNPs waren, keinerlei Anzeichen einer GVHD dokumentiert wurden.

### **5.2.2.3 Bedeutung der NOD2/CARD15-SNPs**

Ziel dieser Arbeit sollte es sein, herauszufinden, ob Merkmalsträger (sowohl Spender, als auch Empfänger) des NOD2/CARD15-SNPs einen Einfluss auf die Inzidenz von akuter GVHD nach allo-HSZT haben. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe des Spearman Korrelationskoeffizienten (Spearman et al. 1904). Anschließend wurde mit Hilfe des Exakten Tests nach Fisher das Auftreten von akuter GVHD Grad 0 – I und Grad II-IV berechnet (Fisher et al. 1925).

Entgegen den bisher veröffentlichten Daten (Holler et al. 2008 und Elmaagacli et al. 2006) fand sich keinerlei signifikanter Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer akuten GVHD und einem NOD2/CARD15-SNP (s. Tabelle 10).

Darüber hinaus ergab sich in einer kombinierten Analyse der drei Varianten ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang. Bei 41 Patienten (18,9 %) und 33 Spendern (19,6 %) wurde mindestens ein SNP des NOD2/CARD15-Gens detektiert und es ergab sich keinerlei signifikanter Unterschied hinsichtlich Häufigkeit und Intensität der akuten GVHD.

### **5.2.3 Der Einfluss von Single Nukleotid Polymorphismen auf die chronische GVHD**

Neben den Resultaten für die akute GVHD war in dieser Arbeit auch von Interesse, ob es einen Unterschied zwischen Merkmalsträgern von einem der vier Genpolymorphismen und Trägern des Wildtyps bezüglich des Auftretens von chronischer GVHD gab. Dafür wurden Spender und Empfänger separat betrachtet.

Weder für Träger des IL-23-Rezeptorgenpolymorphismus noch für Träger von einem der drei SNPs des NOD2/CARD15-Gens fand sich ein Trend oder gar ein signifikanter Zusammenhang für das Auftreten oder den Schweregrad einer chronischen GVHD.

Bei den Berechnungen schien es zunächst so, als könnte für das Auftreten einer chronischen GVHD das verwendete Spendermaterial von Bedeutung sein. Daraufhin erfolgten Berechnungen mit dem Spendermaterial als Variable. Es zeigt sich zwar ein Trend, dass bei Patienten, die eine chronische GVHD entwickelten, periphere Stammzellen verwendet wurden. Das Ergebnis war jedoch für die Probanden in dieser Arbeit nicht signifikant (Daten nicht dargestellt).

Als nächstes sollten die einzelnen Organmanifestationen (Haut, Mundschleimhaut, Leber, Speicheldrüsen, Lunge, Verdauungstrakt) von chronischer GVHD separat hinsichtlich eines Zusammenhangs mit den Trägern eines der vier SNPs analysiert werden. Im Gegensatz zu bisherigen Publikationen (Hildebrandt et al. 2008) ergab sich kein Hinweis auf das verringerte bzw. vermehrte Auftreten von chronischer GVHD an einem bestimmten Organ beim Tragen eines der vier Merkmale. Dem liegt ursächlich am ehesten die geringe Probandenzahl zugrunde, da die chronische GVHD allgemein in nur 22 % (n = 51 Patienten) der Transplantationen als Komplikation auftrat. Abbildung 10 veranschaulicht die Häufigkeit der betroffenen Organe bei der in dieser Arbeit untersuchten Patientengruppe. Bei über der Hälfte der Kinder (n = 33) manifestierte sich die chronische GVHD an der Haut. Besonders häufig wurden auch Leber (n = 21) und Mundschleimhäute geschädigt. Seltenere Hauterscheinungen wie Sklerodermie oder Vitiligo dokumentiert.

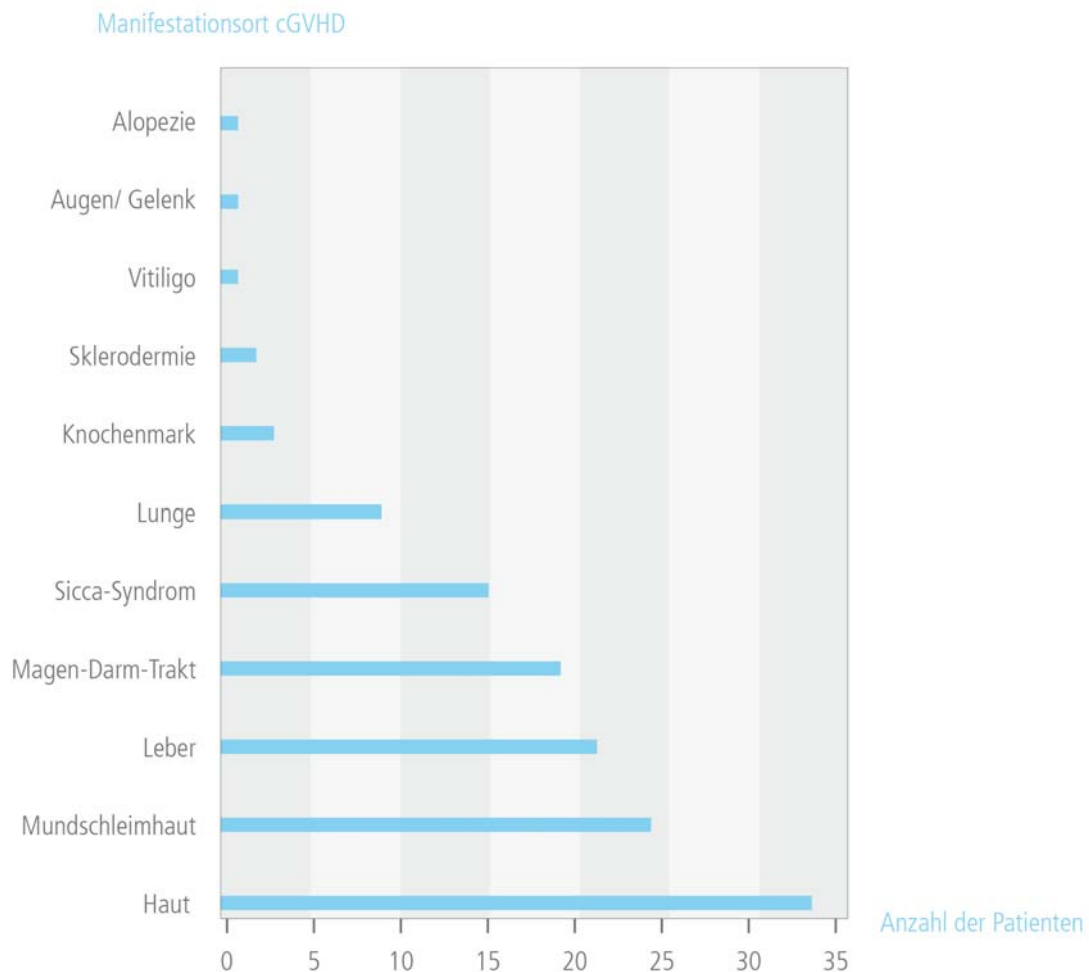


Abbildung 10: Organmanifestationen bei Patienten mit chronischer GVHD.

Es ist nachvollziehbar, dass es bei diesen kleinen Gruppen und der relativen Häufigkeit von SNPs zu keinem signifikanten Ergebnis kam.

### 5.3 Überlebenszeitanalyse

Der Einfluss von den verschiedenen SNPs des NOD2/CARD15-Gens und des IL-23-Rezeptorgens auf das Überleben der Patienten wurde mittels Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse berechnet und in Abbildung 11 dargestellt.

Hierbei fand sich statistisch kein signifikanter Vorteil für das Überleben für Träger der IL-23-Variante ( $p = 0,72$ ). Analog verhielt sich auch die Überlebensdauer für Empfänger mit Spendern, bei denen ein SNP für den IL-23R detektiert worden war ( $p = 0,40$ ).

Keinerlei Tendenz oder statistisch signifikanter Zusammenhang ( $p = 0,95$ ) für das Überleben zeigte sich für Spender, die nicht Träger von einem NOD2/CARD15-SNP waren. Die in anderen Veröffentlichungen beschriebene nachteilige Auswirkung auf das Überleben, wenn beim Spender und/oder Empfänger retrospektiv ein SNP für das NOD2/CARD15-Gen nachgewiesen werden konnte (Holler et al. 2004), hat sich für die Probanden dieser Arbeit nicht bestätigen lassen.

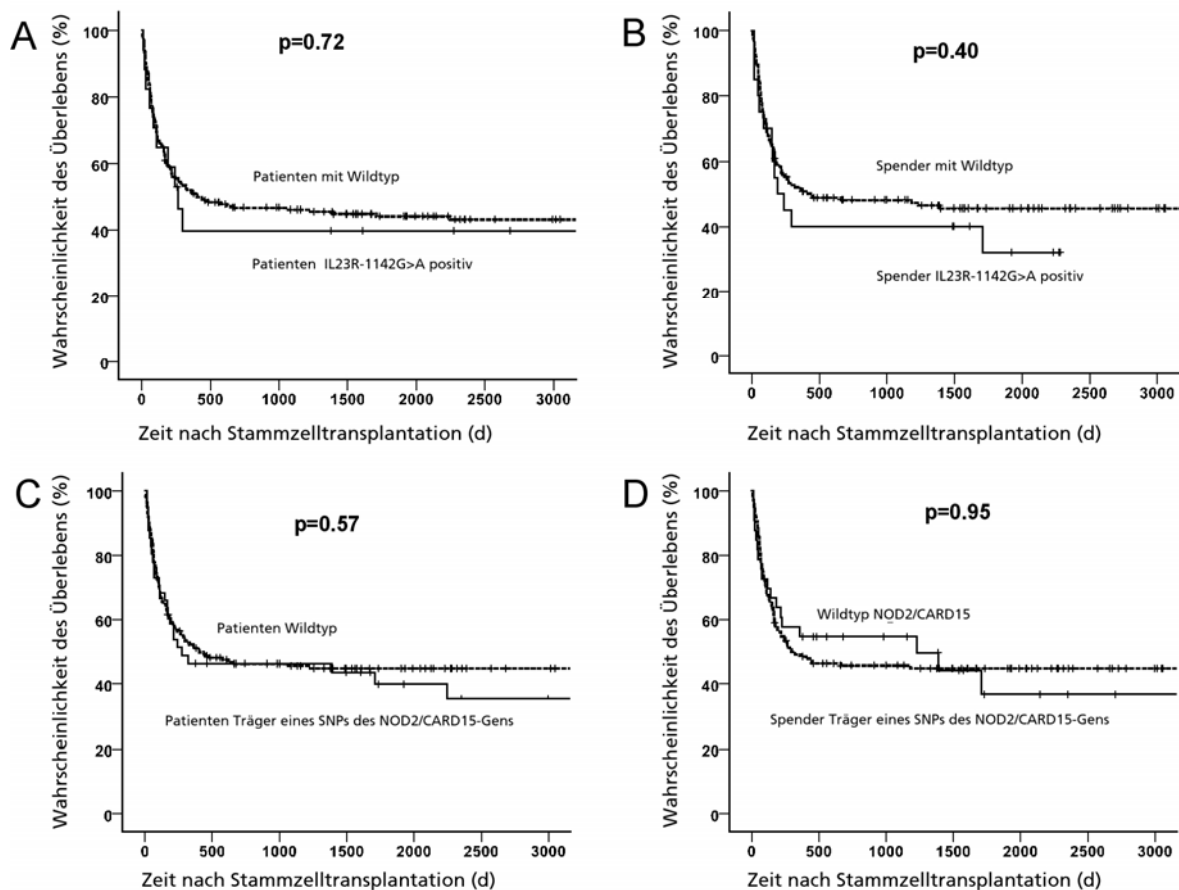


Abbildung 11: Überlebenszeitanalyse nach Kaplan und Meier. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied für das Überleben der Patienten in Abhängigkeit des Genotyps bei Spender oder Empfänger (A-D).

## 5.4 Patienten unter 16 Jahre

Aufgrund der aktuellen Untersuchungen zu den SNPs vom IL-23-Rezeptor und vom NOD2/CARD15-Gen sollte Ziel dieser Arbeit sein, die bisher einzigen Daten im Bereich der Pädiatrie und damit von Patienten unter 18 Jahren retrospektiv auszuwerten. Dabei kam es in einigen Fällen dazu, dass Ergebnisse von Patienten zur Auswertung gelangten, die zum Zeitpunkt der Transplantation bereits über 18 Jahre alt waren. Das ist mit der Tatsache zu erklären, dass der Ausbruch der

Grunderkrankung im Kindesalter stattfand, die Transplantation jedoch erst im Erwachsenenalter. Deshalb führten wir noch einmal eine Analyse beschränkt auf Kinder unter 16 Jahren durch.

Die 199 Patienten bestätigten die Ergebnisse aus den anderen Berechnungen. So konnte mittels Spearmans Korrelationskoeffizient ( $p = 0,024$ ) ein protektiver Einfluss von Spendern mit IL-23R-SNP (17/135, 12,6 %) auf das Auftreten einer akuten, schweren GVHD Grad nachgewiesen werden.

Betrachtet man nur die 17 Patienten mit akuter GVHD Grad II-IV, so wurden diese ausschließlich von Spendern mit dem Wildtyp transplantiert (Exakter Test nach Fisher  $p = 0,003$ ).

Ähnlich wie bei der größeren Patientenzahl führten die anderen Berechnungen zwischen den vier SNPs und beispielsweise dem Auftreten einer cGVHD, dem kumulativen Überleben etc. zu keinem statistisch signifikanten Ergebnis.

## **5.5 DNA-Sequenzierung**

### **5.5.1 Patient Nr. 245**

Die Ergebnisse der DNA-Sequenzierung der vier zufällig ausgewählten DNA-Proben, welche zuvor bereits durch Real-Time PCR allelisch diskriminiert worden waren, bestätigten die vorangegangenen Resultate.

So fand sich bei der Analyse der DNA vom Spender mit der laufenden Nummer 245 laut allelischer Diskriminierung der Wildtyp (s. Abb. 12). Die detektierte Stelle wurde zusätzlich noch mittels DNA-Sequenzierung analysiert und fand an dieser Position ebenfalls die Base Guanin (s. Abb. 13).

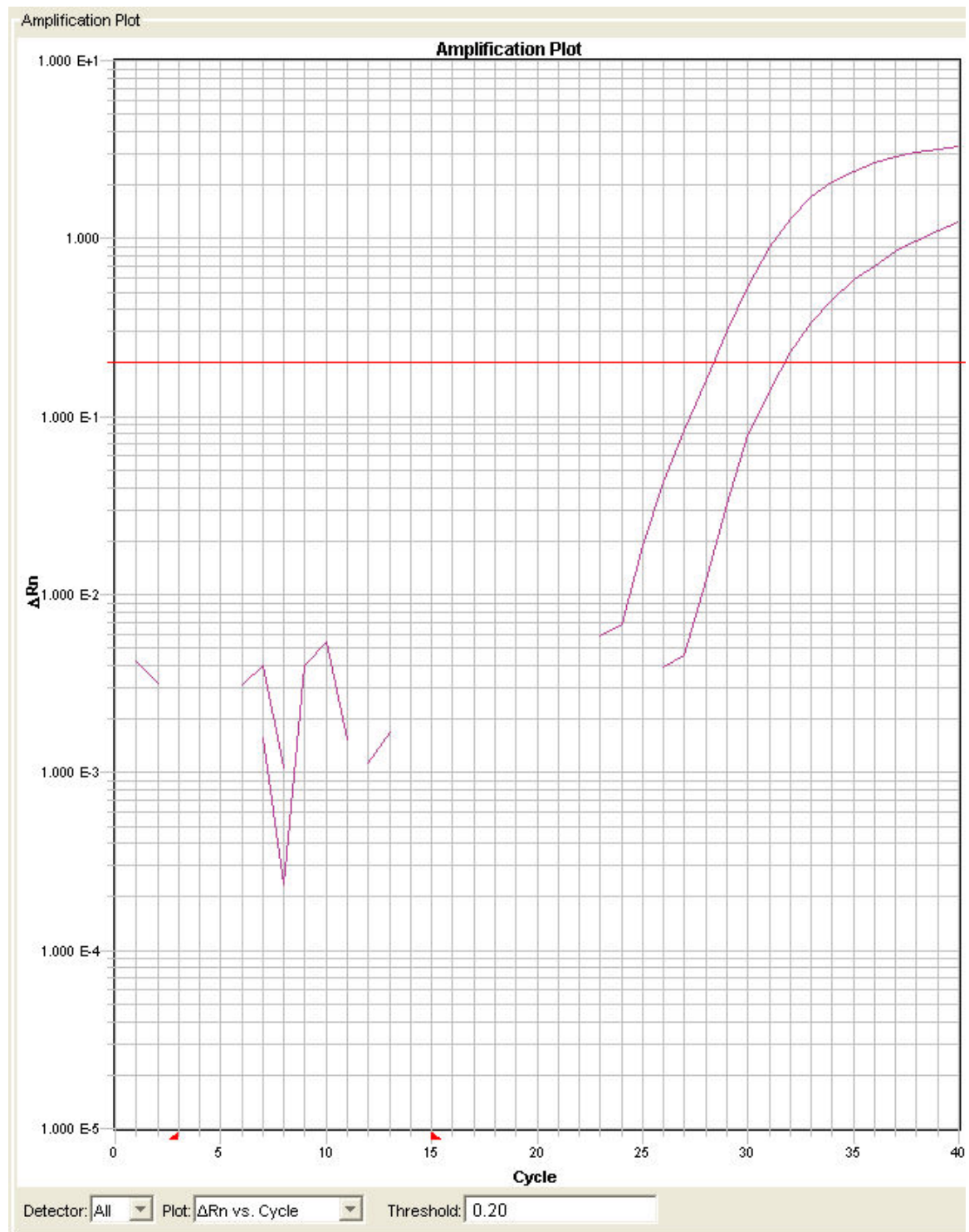


Abbildung 12: Externe Darstellung des Genotyps von Spender Nr. 245. In der Grafik wird die Emissionsenergie der beiden Reportermoleküle in Abhängigkeit der Zykluszahl der Real-Time PCR dargestellt. Beim Vorliegen einer homozygoten Variante emittiert der Reporter des jeweilig homozygot vorliegenden Allels am stärksten und es erfolgt bereits nach 24 Zyklen ein deutlich messbarer Anstieg der Emissionsintensität.

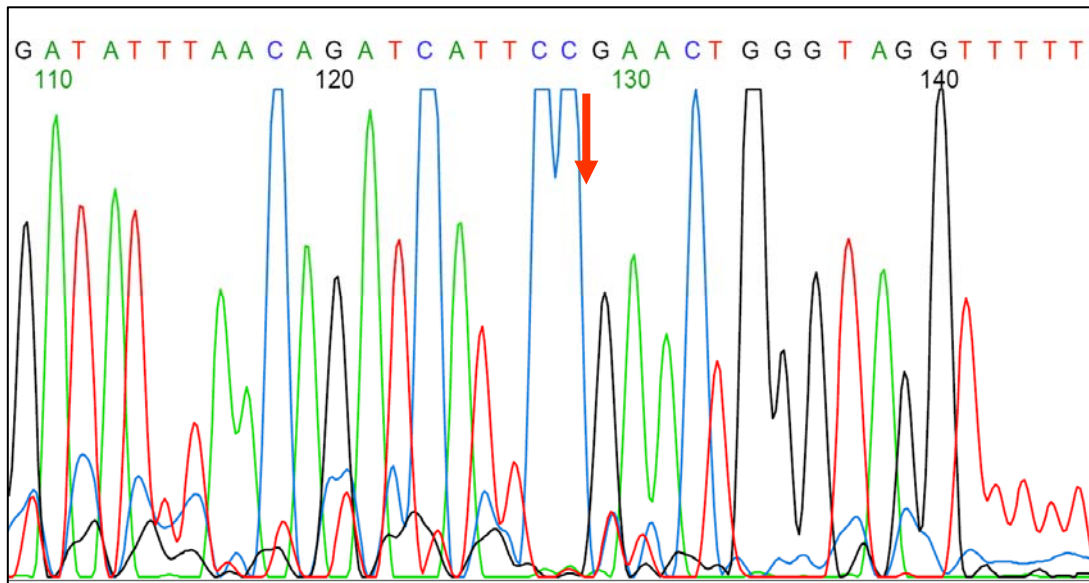


Abbildung 13: DNA-Sequenzanalyse von Spender Nr. 245. Die dunkelblaue Amplitude entspricht der Base Guanin, hellblau Cytosin, rot Thymin und grün Adenin. Der rot markierte Pfeil stellt die zu untersuchende Position dar. An dieser Position (129) hat Guanin (dunkelblau) die höchste Amplitude und es liegt damit ein homozygoter Genotyp vor. Dies entspricht dem Ergebnis aus der Real-Time PCR.

### 5.5.2 Patient Nr. 246

Ebenfalls untersuchten wir das Ergebnis der Real-Time PCR von Patient Nr. 246, welcher sich grafisch in Abbildung 14 als heterozygot darstellte. Die DNA-Sequenzanalyse bestätigte auch hier den vermuteten Genotyp (s. Abb. 15).



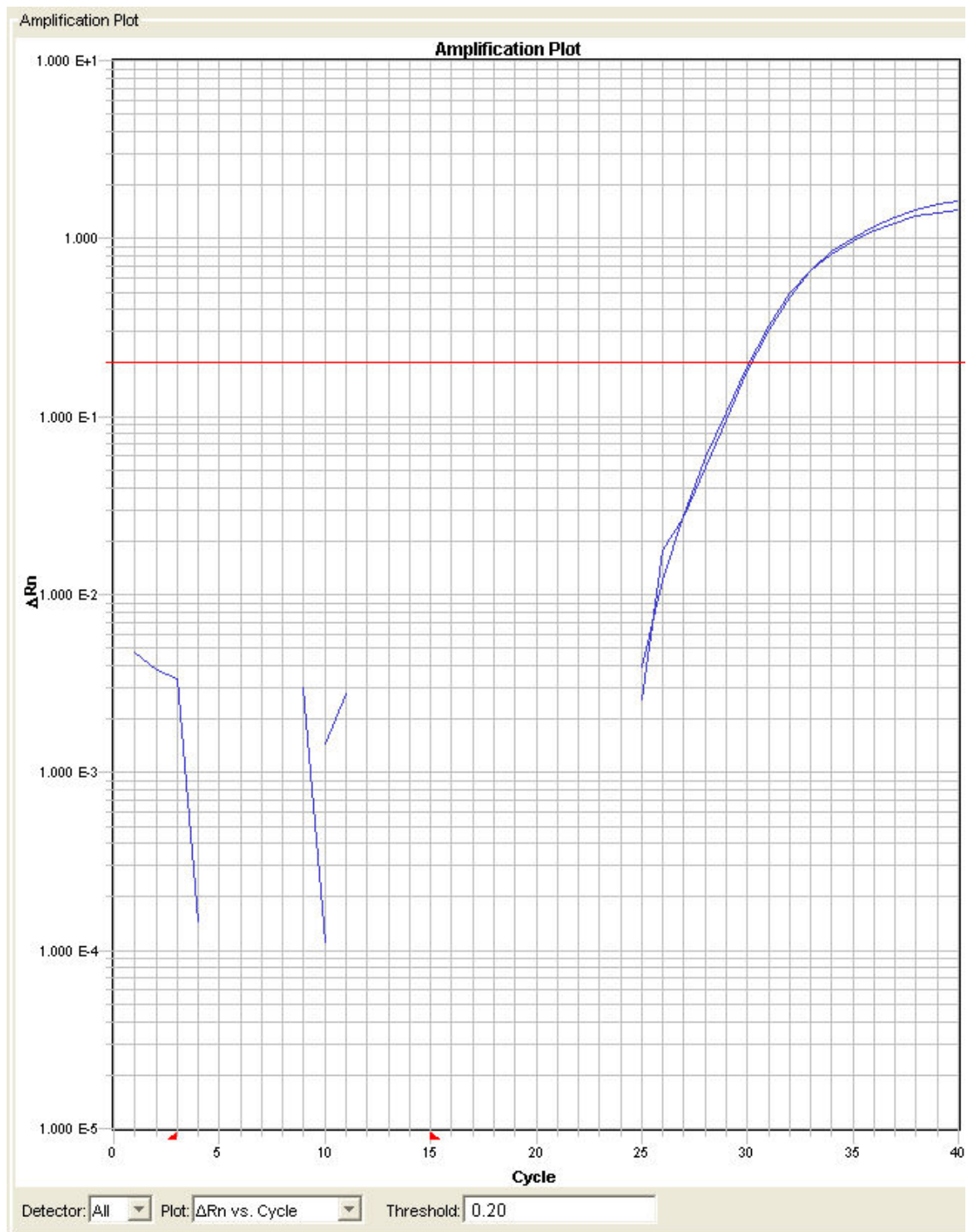


Abbildung 14: Externe Darstellung des Genotyps von Spender Nr. 246. In der Grafik wird die Emissionsenergie ( $\Delta Rn$ ) der beiden Reportermoleküle in Abhängigkeit der Zykluszahl der Real-Time PCR dargestellt. Beim Vorliegen einer heterozygoten Variante erfolgt ein zeitgleicher Anstieg von  $\Delta Rn$  der beiden Reporter.

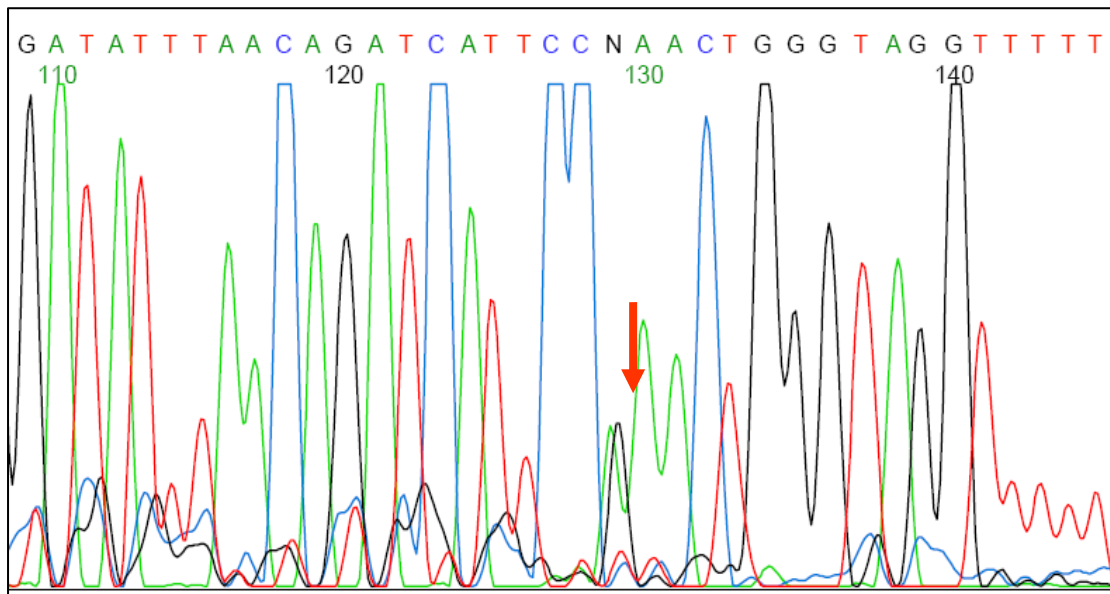


Abbildung 15: DNA-Sequenzanalyse für Spender Nr. 246. Die untersuchte Position zeigt im Gegensatz zu Patient Nr. 245 sowohl den Anstieg des Markers von Guanin, als auch von Adenin (dunkelblau) und bestätigt damit das Ergebnis aus der Analyse mit dem TaqMan®. Der Spender ist heterozygot für das Allel.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Inhaltliche Diskussion**

Trotz intensiver Forschung zählt die GVHD über 40 Jahre nach der ersten Knochenmarkstransplantation heute noch zu den Hauptrisikofaktoren, die das Überleben, sowie die Lebensqualität des Patienten entscheidend limitieren. Neben den Erkenntnissen über die Bedeutung von HLA-Genen, der miHs und diverser Umweltfaktoren ist mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms ein weiterer möglicher Risikofaktor in den Mittelpunkt der aktuellen Forschung auf dem Gebiet der GVHD gerückt: Die Single Nukleotid Polymorphismen.

Zwei Gruppen berichteten 2001 erstmalig von einem Zusammenhang zwischen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und den SNPs des NOD2/CARD15-Gens (Ogura et al. 2001, Hugot et al. 2001). Es folgten Publikationen über einen protektiven Einfluss verschiedener SNPs des IL-23-Rezeptorgens auf CED im Erwachsenenalter (Duerr et al. 2006). Autoren aus den USA, Schottland und Kanada bestätigten die Berichte auch für CED im Kindesalter (Dubinsky et al. 2007, Van Limbergen et al. 2007, Amre et al. 2008). Gemeinsamkeiten zwischen akuter GVHD und CEDs bezüglich ihrer Pathophysiologie und Therapie führten zu der Annahme, dass diese Suszeptibilitätsgene einen Einfluss auf den Verlauf der akuten GVHD nach allogener Stammzelltransplantation haben könnten (Holler et al. 2004, Hassan et al. 2005, Granell et al. 2006, Mayor et al. 2007, Elmaagacli et al. 2008).

Diese Arbeit untersuchte erstmalig den Einfluss von Single Nukleotid Polymorphismus des IL-23-Rezeptorgens auf die GVHD nach allogener HSZT im Kindesalter.

### 6.1.1 Häufigkeit der untersuchten SNPs bei Spender und Empfänger

Mittels RT-PCR wurde DNA von 217 Empfängern (E) und 181 Spendern (S) analysiert. Der Nachweis des IL-23R-SNPs gelang bei 7,8 % der Empfänger. Die Forschungsgruppe von Elmaagacli und Mitarbeitern konnte im Jahr 2008 bei erwachsenen Patienten und ähnlicher Probandenzahl fast doppelt so oft diesen SNP detektieren (Elmaagacli et al. 2008: E: 13,1 bzw. 12,2 %). Trotzdem gelang der Nachweis der Genvariante bei Transplantationspatienten deutlich häufiger als bei Patienten mit CED im Kindesalter (Dubinsky et al. 2007: 2,7 %, van Limbergen et al. 2007: 2,9 %, Amre et al. 2008: 2 %). Bei vergleichbarer Probandenzahl bestätigen die Resultate dieser Arbeit die Annahme, dass bei Kindern mit CED der Anteil der IL-23R-SNP signifikant erniedrigt ist und somit ein möglicher protektiver Einfluss nicht gegeben ist (Dubinsky et al. 2007).

In Übereinstimmung mit der Veröffentlichung der Essener Gruppe waren 11 % der Spender Träger der IL-23R-Genvariante (S: 11,3 bzw. 13,9 %, Elmaagacli et al. 2008).

Anders verhielt es sich mit der Frequenz der NOD2/CARD15-Genpolymorphismen. Bei 19,6 % der Spender konnte eines der drei untersuchten SNPs detektiert werden. Damit gelang der Nachweis der NOD2/CARD15-SNPs im pädiatrischen Kollektiv teilweise doppelt so häufig wie in anderen Arbeiten (Holler et al. 2004: 13,7 %, 2006: 8 %, Granell et al. 2006: 8 %, Sairafi et al. 2008: 11 % usw.). Dieses Ergebnis unterstreicht die Annahme von Mayor, dass es geografische Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der NOD2/CARD15-SNPs gibt (Mayor et al. 2008). Eine genaue Analyse über das Herkunftsland des Spenders ist in dieser Promotionsarbeit nicht erfolgt, weshalb sich keine Rückschlüsse über eine mögliche regionale Häufung von SNPs ziehen lassen.

Für die Hypothese der geografischen Häufigkeitsverteilung spricht die Anzahl der Empfänger mit nachweisbarem SNP des NOD2/CARD15-Gens. Die Ergebnisse der deutschen Arbeitsgruppen lagen zwischen 18,4 % und 21,8 % (Holler et al. 2004, Elmaagacli et al. 2008). In dieser Arbeit waren 18,9 % der Empfänger Träger von mindestens einem SNP. Die spanische Gruppe um Granell detektierte lediglich bei 11 % der Empfänger einen Polymorphismus, die schwedische Gruppe um Sairafi bei 7,6 % der Patienten und die englische Gruppe bei 13 % der Patien-

ten eine Genvariante (Granell et al. 2006, Madrigal et al. 2007, Sairafi et al. 2008). Das Alter der Patienten schien keinen Einfluss darauf zu haben, da dieses, ausgenommen von der vorliegenden Arbeit, in allen Publikationen vergleichbar war (medianes Alter bei Holler et al. 2004: 42, Granell et al. 2006: 42, Madrigal et al. 2007: keine Angaben, Elmaagacli et al. 2008: 39, Sairafi et al. 2008: 37, Nguyen et al. 2010: 37).

Hugot et al. veröffentlichten 2007 in ihrem Paper über die Häufigkeitsverteilung der NOD2/CARD15-SNPs in den verschiedenen ethnischen Gruppen, dass Träger dieser SNPs außerhalb der kaukasischen Gruppe bedeutend seltener sind (Hugot et al. 2007). Dies nutzte auch die Gruppe um Nguyen et al. als Erklärungsansatz für ihre geringen Nachweisraten in der US-amerikanischen Bevölkerung (Nguyen et al. 2010).

Hassan et al. waren 2005 die ersten, die einen Zusammenhang zwischen NOD2-Polymorphismen und gastrointestinaler GVHD nach allogener HSZT bei Kindern untersuchten. Die vergleichsweise hohe Nachweisrate der SNPs bei 59 % der Empfänger erklärt sich mit der vergleichsweise niedrigen Probandenzahl (n = 59, Hassan et al. 2005).

### **6.1.2 GVHD und der IL-23R-Genpolymorphismus R381Q**

Innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation entwickelten 46 % der Patienten der vorliegenden Arbeit Symptome der akuten GVHD. In Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur manifestierte sich die GVHD bei 77 % der Kinder (n = 82) an der Haut und bei 47 % (n = 50) im MDT (Ferrara et al. 2009).

Es konnte nachgewiesen werden, dass organspezifische Chemokine, wie CCL2-5, CXCL-2, CXCL9-11, CCL17 und CCL27 in der Haut, Leber, Lunge und MDT während der akuten GVHD überexprimiert werden (Wysocki et al. 2005). Erklärungen, weshalb die Lunge aber ein Hauptmanifestationsort der chronischen und nicht der akuten GVHD ist, gibt es derzeit noch nicht.

In 22 % der Fälle chronifizierte die GVHD. Mit 75 % bzw. 83 % wurden Symptome der cGVHD in der Studie von Elmaagacli und Mitarbeitern deutlich häufiger dokumentiert (Elmaagacli et al. 2008). Die Einteilung der GVHD in die verschiedenen Stadien erfolgte nach den gleichen Kriterien (Przepiorka et al. 1995, Sullivan et al.

1991). Das mediane Alter der Patienten lag mit 40 bzw. 41 Jahren deutlich über dem der Patienten dieser Promotionsarbeit (11 Jahre). Aus der Publikation von Klingemann et al. ist bekannt, dass Patienten, die zum Zeitpunkt der Transplantation 45 Jahre und älter sind, ein signifikant erhöhtes Risiko haben, eine akute GVHD auszubilden. Infolge dessen steigt auch die Wahrscheinlichkeit, dass die Krankheit leichter chronifizieren kann (Klingemann et al. 1986).

70,9 % bzw. 82,8 % der Patienten hatten in der Arbeit von Elmaagacli im Rahmen der Konditionierung eine Ganzkörperbestrahlung erhalten, während dieses nur für 3,9 % der Kinder in der vorliegenden Arbeit zutraf. Auch bei der amerikanischen Arbeitsgruppe um Nguyen erfolgte in 73 % der Fälle eine Bestrahlung (Nguyen et al. 2010).

Man kann davon ausgehen, dass dadurch die Vulnerabilität des Gewebes erhöht wurde, bei gleichzeitig verminderter Regenerationsfähigkeit des Gewebes aufgrund des höheren Altersdurchschnitts (Chao et al. 1997, Hill et al. 1997). Das könnte die Unterschiede in der Inzidenz der chronischen GVHD erklären.

Erstmalig konnte mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ein protektiver Einfluss des IL-23R-SNPs beim Spender auf den Verlauf der akuten GVHD nach allogener HSZT im Kindesalter nachgewiesen werden. 5 % der Patienten, deren Spender Träger der IL-23R-Genvariante waren, entwickelten eine GVHD Grad I oder höher. Im Vergleich dazu wurden bei über 33 % der Kinder Symptome einer schwergradigen GVHD dokumentiert, die einen Spender ohne IL-23R-SNP hatten (Exakter Test nach Fisher  $p = 0,009$ ). Diese hochsignifikanten Ergebnisse bestätigen die Resultate bei Erwachsenen nach allogener HSZT. Im Gegensatz dazu entwickelte kein Kind eine schwere GVHD Grad III-IV, während 4 % bzw. 3,8 % der erwachsenen Patienten diese trotz Spender mit IL-23R-Genvariante ausbildeten (Elmaagacli et al. 2008). Dies unterstreicht die Bedeutung des IL-23R-SNPs für die allogene HSZT im Kindesalter.

Betrachtet man die Pathophysiologie der GVHD, so lassen sich die Ergebnisse gut mit der Effektorphase der GVHD erklären (Cyster et al. 2005, Elmaagacli et al. 2006). Nach der allogenen HSZT sind es die Spenderlymphozyten, die das Gewebe des Patienten als „fremd“ erkennen. Infolge dessen kommt es an den Prädektionsstellen der Immunabwehr (Haut, Schleimhäute und MDT) zur Entzündungsreaktion mit der charakteristischen Symptomatik (Korngold et al. 1978). Der

IL-23R befindet sich genau auf diesen Zellen, die die o.g. Effektorphase induzieren (dendritische Zellen, CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, CTLs, NK-Zellen etc., Parham et al. 2002). Kommt es infolge des Austauschs von Arginin durch Glutamin zum Verlust der Funktion des Rezeptors, ist der proinflammatorische Signaltransduktionsweg des IL-23 gestört und die klinische Symptomatik könnte vergleichsweise milder ausfallen.

Diese Hypothese unterstützen die Forschungsergebnisse von Gruppen, die sich mit der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beschäftigen. Die Entdeckung des IL-23-Rezeptors und seiner Bedeutung für die Aufrechterhaltung von Th<sub>17</sub>-induzierten Entzündungsreaktionen führte in den letzten Jahren zu explosionsartigen Vermehrung von Studien zum IL-23 und weltweiten Genomanalysen (Aggarwal et al. 2003). Erhöhte IL-23 Werte konnten bei Patienten mit Psoriasis (Piskin et al. 2006), Autoimmun-Encephalitis (Cua et al. 2003, Sonobe et al. 2008), Sjögrens Syndrom (Nguyen et al. 2008) und Systemischem Lupus erythematoses (SLE, Wong et al. 2008) nachgewiesen werden.

Ob es sich bei dem IL-23R-SNP R381Q tatsächlich bei all diesen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises um eine protektive Genvariante handelt, wird derzeit in der aktuellen Literatur diskutiert.

Cargill et al. veröffentlichen 2007 Ergebnisse zu einer großen Studie aus Nordamerika, die den IL-23R-SNP als Risikogen für Psoriasis bezeichnete. Nur die Kombination der IL-23R-1142G>A-Variante mit dem gleichzeitigen Vorhandensein des IL-23R-SNPs L310P (rs 7530511) brachte jedoch statistisch signifikante Ergebnisse. Betrachtet man die Frequenz des IL-23R-SNPs R381Q hingegen allein, war diese bei den Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe prozentual verringert (Cargill et al. 2007).

Capon et al. berichteten im selben Jahr von einem starken protektiven Einfluss des IL-23R-SNPs auf den Schweregrad der Psoriasis (Capon et al. 2007). Autoren aus Australien und Kanada gelingt dies auch für die Spondylitis ankylosans, einer hereditären, entzündlichen Erkrankung der Wirbelsäule (Capon et al. 2007, Rahman et al. 2008). Karaderi et al. bemerkten in ihrer Publikation zur IL-23R-Genvariante, dass die Polymorphismen das Risiko theoretisch sowohl senken, als auch erhöhen können und dass der Signalweg des IL-23 auf jeden Fall relevant in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu sein scheint (Karaderi et al. 2008).

Nguyen et al. fanden in ihrer aktuellen Veröffentlichung keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis des IL-23R-Genvariante R381Q und dem Schweregrad der GVHD nach allo-HSZT. Der Autor diskutiert den fehlenden Nachweis mit dem Ansatz, dass sowohl die Nachweisrate des IL-23R-SNPs, als auch die Inzidenz der akuten GVHD vergleichsweise niedrig waren. Dies könnte die fehlende Signifikanz, die in dem amerikanischen Artikel mit  $p = 0,01$  festgelegt wurde, erklären (Nguyen et al. 2010).

In der aktuellen Literatur wird ein Unterschied in der Inzidenz der akuten GVHD aufgrund der ethnischen Herkunft kontrovers diskutiert. Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2005, die die verminderte Frequenz der akuten GVHD in der japanischen und schwedischen Bevölkerungsgruppe belegt (Oh et al. 2005), steht im Widerspruch zu den Erkenntnissen einer schwedischen Gruppe, die keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen ethnischer Herkunft und Inzidenz der akuten GVHD demonstrieren konnten (Remberger et al. 2001).

Die Ergebnisse von Oh et al. galten jedoch für HLA-identische, verwandte Spender (Oh et al. 2005), während die 390 Patienten der amerikanischen Multicenter-Studie ausschließlich HLA-identische Fremdspender hatten.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit könnten vor allem für die Spenderauswahl von Kindern mit angeborenen Stoffwechselkrankheiten und nicht-malignen, immunologischen Grunderkrankungen von Vorteil sein. Diese Patienten profitieren nicht von einem GVT-Effekt, der mit einer GVHD einhergeht (Gale et al. 1990). Eine Genotypisierung des Spenders könnte somit erstmalig als diagnostische Maßnahme den klinischen Verlauf nach Transplantation beeinflussen.

Eine medikamentöse Therapie mit einem monoklonalen Antikörper, wie sie bereits für die CED in der Entwicklung ist, wäre ebenfalls denkbar (Elson et al. 2007).

Der IL-23R-SNP beim Empfänger allein hatte in dieser Arbeit weder einen Einfluss auf das Auftreten der akuten, noch der chronischen GVHD. Es entwickelten prozentual mehr Kinder eine GVHD Grad II-IV, die Träger des Wildtyps waren, jedoch blieben die Ergebnisse ohne statistische Signifikanz (18 % vs. 29 %, Exakter Test nach Fisher,  $p = 0,24$ ).

Diese Resultate lassen sich gut mit der Tatsache vereinbaren, dass der Patient nach Transplantation nicht mehr seine ursprünglichen Immunzellen besitzt, son-



dern die des Spenders. Folglich sind auch vorher bestehende Genvarianten in den immunkompetenten Zellen des Empfängers ohne Konsequenz.

Lediglich während der afferenten Phase der GVHD-Entwicklung könnte ein IL-23R-SNP mildere Schädigungen im gastrointestinalen Bereich bewirken und infolge dessen die Symptomatik der akuten GVHD im MDT leichter ausfallen.

Elmaagacli et al. konnten bei Erwachsenen sowohl beim Empfänger als auch beim Spender einen signifikanten Einfluss der IL-23R-Variante auf die Inzidenz der akuten GVHD nachweisen, wenn der Spender ein HLA-identisches Geschwisterkind war. Die zweite Kohorte, die die Arbeitsgruppe diesbezüglich untersuchte, erhielt SZ von einem HLA-identischen Fremdspender und konnte die Resultate der ersten Kohorte nicht bestätigen (GVHD Grad II-IV SNP vs. Wildtyp: 56,4 % vs. 54,2 %, Elmaagacli et al. 2008). Unter der Annahme, dass das Spendermaterial einen Einfluss zu haben scheint, erklärt sich bei der Betrachtung unseres Patientenkollektivs, warum wir die Ergebnisse von Elmaagacli diesbezüglich nicht bestätigen konnten: Lediglich 43,7 % der Empfänger (n = 101) dieser Arbeit hatten die Möglichkeit von einem HLA-identischen Geschwisterkind Spendermaterial zu erhalten. Die Mehrzahl der Patienten war entweder auf einen HLA-identischen Fremdspender angewiesen, erhielt SZ von einem Elternteil oder es lag ein HLA-mismatch (engl., Missverhältnis) vor. Bei diesen Patienten kann man zusätzlich davon ausgehen, dass sie eine intensiviertere Prophylaxemedikation erhalten haben müssen, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert.

Eine weitere Erklärung, weshalb der Empfängergenotyp einen geringeren Einfluss auf den Schweregrad der GVHD zu haben scheint, ist die bedeutsame Rolle der Spenderlymphozyten. Da nach der Konditionierung im Idealfall keine eigenen T-Lymphozyten mehr vorliegen, scheint der Einfluss der Genvarianz beim Empfänger nur von sekundärer Bedeutung zu sein.

Es ergab sich fünfmal die Konstellation, dass sowohl beim Empfänger, als auch beim Spender die IL-23R-1142G>A-Variante detektiert werden konnte (3 % der Empfänger-Spender-Paare). Interessanterweise bildeten diese Kinder keinerlei Symptomatik einer akuten GVHD aus. Die Hypothese, dass Patienten mildere Verläufe der GVHD ausbilden, wenn sowohl Spender, als auch Empfänger Träger des IL-23R-SNPs R381Q sind, können angesichts der geringen Fallzahlen mit

dieser Promotionsarbeit nicht unterlegt werden. Dafür werden in Zukunft größere Multicenter-Studien mit pädiatrischen Patienten benötigt.

### **6.1.3 NOD2/CARD15-Genpolymorphismen und GVHD**

Gemeinsamkeiten von GVHD und CED in der Pathophysiologie und Therapie führten zu der Hypothese, dass sich nach den Erkenntnissen aus dem Jahr 2001 zum Suszeptibilitätsgen NOD2/CARD15 ähnliche Ergebnisse für den Verlauf nach allo-HSCT reproduzieren lassen könnten (Ogura et al. 2001, Hugot et al. 2001, Holler et al. 2004).

Ziel dieser Arbeit sollte es darum sein, zu untersuchen, ob die drei Polymorphismen des NOD2/CARD15-Gens bereits im Kindesalter einen Einfluss auf das Auftreten der GVHD nach SZT haben könnten.

Entgegen den initialen Veröffentlichungen hatte weder der Nachweis eines der drei SNPs beim Spender, noch beim Empfänger einen signifikanten Einfluss auf den Verlauf der GVHD nach Transplantation (Holler et al. 2004 und 2008, Elmaagacli et al. 2006).

Elmaagacli et al. kamen 2006 in ihrem Patientenkollektiv zu dem überraschendem Ergebnis, dass der Nachweis einer Mutation des NOD2/CARD15-Rezeptorgens beim Spender sich protektiv auf den Schweregrad der GVHD nach allo-HSCT beim Empfänger auswirkte. Nicht ein Patient entwickelte Symptome einer akuten GVHD Grad III-IV, wenn sein Spender Träger eines NOD2/CARD15-SNPs war ( $p = 0,003$ , Elmaagacli et al. 2006). Der Autor erklärte sich das Resultat mit der NF- $\kappa$ B abhängigen TH<sub>1</sub>-Lymphozytendifferenzierung, die beim insuffizienten NOD2/CARD15-Rezeptor fehlt (Watanabe et al. 2004). Infolge dessen konnte eine Entzündungsreaktion im Sinne einer GVHD-Reaktion nicht aufrechterhalten werden, vermutet die Forschungsgruppe (Elmaagacli et al. 2006).

Bedeutend mehr Patienten erkrankten an einer schwergradigen, akuten GVHD, wenn sowohl beim Spender, als auch beim Empfänger eine NOD2/CARD15-Genvariante detektiert werden konnte ( $p < 0,03$ , Elmaagacli et al. 2006). Damit müsste anhand der Ergebnisse der Essener Gruppe davon ausgegangen werden, dass der Genotyp des Empfängers den entscheidenden Einfluss auf das Auftreten der GVHD nach allo-HSCT hat. Dies stünde im Widerspruch zu den Resultaten

der Regensburger Gruppe, die den Haupteinfluss des Risikogens NOD2/CARD15 dem Genotyp des Spenders zugewiesen haben (Holler et al. 2008).

Die vorliegende Dissertation bestätigt damit die Ergebnisse der spanischen Gruppen um Sairafi und Granell, die ebenfalls keinen Einfluss der NOD2-Polymorphismen in ihrem Patientenkollektiv nachweisen konnten (Granell et al. 2006, Sairafi et al. 2008). Mit 198 Empfänger-Spender-Paaren lag die Anzahl der Probanden bei Sairafi und Mitarbeitern deutlich unter den 342 von Holler et al. (Sairafi et al. 2008, Holler et al. 2008). Die amerikanische Gruppe um Nguyen et al. zeigte jedoch in diesem Jahr, dass auch bei einem Patientenkollektiv mit 390 ausgewerteten Patienten und ihrem HLA-identischen Fremdspender die Ergebnisse der Regensburger Gruppe nicht reproduzierbar waren (Nguyen et al. 2010).

Mayor et al. kamen ebenso bei der Auswertung von 196 ALL-Patienten zu keinem statistisch signifikanten Ergebnis (Mayor et al. 2006).

Zusätzlich zu den Berechnungen der Häufigkeiten von SNPs insgesamt, erfolgte eine differenzierte Betrachtung vom SNP 8, 12 und 13 des NOD2/CARD15-Rezeptorgens. Die Tatsache, dass der Single Nukleotid Polymorphismus 13 zur Verkürzung des Proteins von 1040 auf 1007 AS führt und damit einem wahrscheinlichen Funktionsverlust zur Folge hat, ließ eine besondere Rolle für das Ergebnis erwarten (Ogura et al. 2001, Holler et al. 2008). In der aktuellen Literatur präzisierten ausschließlich die Gruppen um Holler, Hassan und Nguyen ihre Untersuchungen auf einen möglichen individuellen Einfluss der drei SNPs (Hassan et al. 2005, Holler et al. 2008, Nguyen et al. 2010).

Galt bei der deutschen Gruppe 2004 noch der Nachweis von einem der drei SNPs beim Spender oder Empfänger als prädisponierend für eine schwere GVHD und ein vermindertes Gesamtüberleben, konnten diese Ergebnisse 2008 in einer größeren Multicenter-Studie nicht bestätigt werden (Holler et al. 2004, 2008). Es zeigte sich jedoch ein Zusammenhang zwischen dem SNP 13 beim Spender und einer erhöhten Inzidenz akuter GVHD Grad III-IV. Übereinstimmend mit dieser Hypothese war fast jeder dritter Patient (6/10) der englischen Forschungsgruppe, der eine schwere GVHD des Magen-Darm-Trakts (MDT) entwickelte, Träger des SNP 13 (Hassan et al. 2005). Angesichts der kleinen Patientenzahl ließ sich hier lediglich eine Tendenz ableiten.

Holler argumentierte mit dem Hinweis, dass das NOD2/CARD15-Protein vermehrt in den Epithelzellen des Ileums exprimiert wird und dort entscheidend zur bakteriellen Abwehr beiträgt (Hisamatsu et al. 2003). Der Funktionsverlust des NOD2/CARD15-Rezeptors könnte eine höhere Anfälligkeit für Infektionen zur Folge haben und damit die gastrointestinale GVHD fördern (Holler et al. 2008). Was dabei nicht erklärt wurde, ist die Tatsache, dass das intestinale Epithel Empfänger-DNA enthält. Diese Argumentationsreihe würde nur auf die Ergebnisse der Gruppe um Hassan und Mitarbeiter passen, die eine Zunahme der gastrointestinalen GVHD im Zusammenhang mit dem SNP 13 beim Empfänger nachweisen konnten, wenn auch ohne statistische Signifikanz.

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse an pädiatrischen Patienten konnten die Resultate der englischen und deutschen Gruppe nicht bestätigen (Hassan et al. 2005, Holler et al. 2008). Die Frequenz des SNP 13 beim Spender war mit 6,7 % bei der Regensburger Gruppe fast identisch mit dieser Arbeit (SNP 13 S: 6,6 %), jedoch handelte es sich bei der Publikation von Prof. Holler und Mitarbeitern um eine große, europaweite Forschungsarbeit (n = 342). Auch hinsichtlich der Spenderauswahl unterschieden sich die beiden Arbeiten bezüglich der Tatsache, dass alle Spender bei Holler nicht-verwandt mit dem Empfänger waren, während in dieser Promotionsarbeit in über 44 % der Fälle die SZ von einem HLA-identischen Geschwisterkind stammten (Holler et al. 2008).

Weiterführend gedacht ist es bei einer verhältnismäßig niedrigen Nachweisrate der NOD2/CARD15-SNPs fraglich, wie realisierbar eine Selektion des Spenders anhand seines Genotyps wäre.

Im Fokus der Untersuchungen stand neben der akuten auch die chronische GVHD, die bei erwachsenen Patienten nach allo-HSZT im rezidivfreien Intervall immer noch die Haupttodesursache ist (Lee et al. 2002).

Es gelang kein Nachweis eines Einflusses der NOD2/CARD15-Polymorphismen auf den Verlauf der cGVHD nach SZT. Dieses Resultat wird von den Forschungsergebnissen aus der aktuellen Literatur untermauert (Holler et al. 2004, Elmaagacli et al. 2006, Madrigal et al. 2007, Hildebrandt et al. 2008, Mayor et al. 2006, Sairafi et al. 2008, Nguyen et al. 2010). Kein Manifestationsort der cGVHD konnte statistisch signifikant mit dem Nachweis eines der NOD2/CARD15-SNPs beim Spender

oder Empfänger in Zusammenhang gebracht werden. Angesichts der verhältnismäßig geringen Patientenzahl ( $n = 51$ ), die das Vollbild einer chronischen GVHD entwickelten und der prozentual niedrigen Nachweisrate der drei SNPs ist es nachvollziehbar, dass eindeutige Ergebnisse einer größeren Anzahl an Studienteilnehmern bedürfen.

Hildebrandt et al. berichteten in ihrem Artikel von dem neuen Risikofaktor NOD2/CARD15 für die Entwicklung einer Bronchiolitis obliterans (BO, Hildebrandt et al. 2008). Diese nicht-infektiöse, pulmonale Erkrankung gehört zu den late-onset Erkrankungen und kann noch Monate bis Jahre nach Transplantation auftreten (Patriarca et al. 2004). Von den 427 untersuchten Patienten der Regensburger Gruppe erkrankten 11 Patienten (2,6 %). Die multivariate Cox-Regressionsanalyse belegte, dass die Mutation beim Empfänger und eine zusätzlich bestehende cGVHD die wichtigsten Risikofaktoren für die BO waren. Die Inzidenz der BO stieg von 1,3 % auf 22,3 %, wenn der Empfänger Träger einer der drei SNP Varianten war ( $p < 0,001$ ). Der Autor merkte an, dass die Pathogenese einer BO noch nicht eindeutig geklärt sei (Hildebrandt et al. 2008). Man weiß jedoch, dass grundsätzlich ein Funktionsverlust der bronchialen Epithelzellen (EZ), sowie alloreaktive T-Zellen entscheidend beteiligt sind (Jaramillo et al. 2005). Hippenstiel et al. gelang 2005 der Nachweis von NOD2/CARD15 in den EZ der Bronchiolen, was die Lunge mit in das Untersuchungsfeld des Suszeptibilitätsgens zog.

Damit bestätigen Hildebrandt und Mitarbeiter die Hypothese von Granell et al., dass NOD2/CARD15-SNPs einen Risikofaktor für pulmonale Erkrankungen bei Patienten nach allo-HSZT darstellen. Die spanische Gruppe wies bereits 2006 in ihrer Veröffentlichung darauf hin, dass alle Patienten mit einem NOD2/CARD15-SNP, die in Remission verstarben, ausschließlich an einer Pneumonie erkrankten (100 % vs. 58 % Wt, Granell et al. 2006).

Die Ergebnisse von Hildebrandt und Granell et al. konnte die vorliegende Forschungsarbeit nicht bestätigen. Bei lediglich 5,5 % der Kinder wurde eine pulmonale Beeinträchtigung nach Transplantation dokumentiert. Davon verstarben 33,3 % bereits innerhalb weniger Wochen im Rahmen eines Multiorgan- oder Lungenversagens. Bei den übrigen Patienten wurde keine BO dokumentiert, so dass die Untersuchungsergebnisse der Regensburger Gruppe mit unserem Patientenkollektiv nicht nachvollzogen werden konnten.

### 6.1.4 Überlebenszeitanalyse

2008 postulierten Elmaagacli und Mitarbeiter in ihrem Artikel zur Bedeutung des IL-23R, dass bei Patienten mit der Genvariante R381Q die Letalität in der Remissionsphase (engl. death in remission) deutlich reduziert ist. Für die Hypothese, dass der IL-23R-SNP einen verminderten death in remission zur Folge hat, sprechen die Ergebnisse einer kalifornischen Gruppe aus dem Jahr 2006. Die Autoren konnten im Experiment mit Knockout-Mäusen beweisen, dass IL-23 durch die Induktion der Matrix Metalloprotease 9 (MMP9) die Angiogenese im Tumorgewebe steigern und gleichzeitig die CD8<sup>+</sup>-T-Zellinfiltration herabsetzen kann (Langowski et al. 2006). Geht man davon aus, dass der IL-23-Signaltransduktionsweg bei Patienten mit IL-23R-SNP inhibiert ist, könnte dies einen verminderten Tumorprogress nach Transplantation bedingen.

Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kindern konnte weder ein Einfluss des IL-23R-SNPs R381Q auf die Letalität in Remission, noch auf das Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Übereinstimmend mit der Publikation der Essener Gruppe hatten Patienten mit einem IL-23R-SNP positiven Spender keinen Vorteil bezüglich des Rezidivrisikos. Bedenkt man, dass eine mildere GVHD auch mit einem verminderten GVT-Effekt einhergeht (Truitt et al. 1976), war dies auch nicht zu erwarten. Die Resultate dieser Dissertation wurden durch die Arbeit der amerikanischen Gruppe untermauert, die mit ihrem Patientenkollektiv die Ergebnisse von Elmaagacli und Mitarbeitern ebenfalls nicht reproduzieren konnten (Nguyen et al. 2010).

Bei der Diskussion um die Bedeutung der NOD2/CARD15-Genvarianten bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten fanden sich in der aktuellen Literatur kontroverse Meinungen.

Initiale Publikationen von Holler und Mitarbeitern demonstrierten zunächst einen hohen Impact auf den Verlauf und das Gesamtüberleben nach allo-HSZT. Die Inzidenz der therapieassoziierten Mortalität nach einem Jahr (engl. treatment related mortality, TRM) lag bei Empfänger-Spender-Paaren (HLA-identisch, verwandt) mit Wildtyp bei 20 % und stieg bei Paaren mit Nachweis eines der drei SNPs auf mehr als das Vierfache an (83 %, Holler et al. 2004). Im selben Patientenkollektiv konn-

te mit dem Nachweis der SNPs bei Empfänger und Spender neben der TRM auch eine Zunahme des Schweregrads der akuten GVHD verzeichnet werden. Bei dem Großteil der Patienten wurde die Indikation zur allogenen HSZT aufgrund einer ALL gestellt (46 %). Geht man von der Theorie aus, dass eine stärkere GVHD einen ausgeprägten GVL-Effekt zur Folge hat, stehen diese zwei Ergebnisse im Widerspruch.

Eine ähnliche Konstellation ergab sich bei dem Artikel der Essener Gruppe, die ihre Ergebnisse 2 Jahre später veröffentlichten (Elmaagacli et al. 2006). Sowohl die akute GVHD Grad III-IV, als auch die TRM (über 5 Jahre) waren signifikant erhöht, wenn eine Genvariante beim Spender oder beim Empfänger-Spender-Paar detektiert werden konnte ( $p = 0,02$ ). Über die Hälfte der Patienten litt an einer Leukämie (51 %) und somit widersprechen sich auch hier die Hypothese des GVL-Effekts, der bei einer ausgeprägten GVHD zu erwarten wäre und die unbeeinträchtigte Rezidivrate (Holler et al. 2004, Elmaagacli et al. 2006).

Diese Ergebnisse konnte eine erweiterte Multicenter-Studie der Regensburger Gruppe mit 140 zusätzlichen Patienten und ihrem HLA-identischen Spender untermauern (Holler et al. 2006). Zusätzlich konnte ein verkürztes Gesamtüberleben bei den Patienten nachgewiesen werden, die selbst Träger eines SNPs waren oder wo sowohl beim Spender, als auch beim Empfänger ein NOD2/CARD15-Genpolymorphismus detektiert werden konnte. Hatte lediglich der Spender eine Genvariante, zeigte sich kein Unterschied im Vergleich zum Wildtyp auf die Dauer des Gesamtüberlebens (Holler et al. 2006).

Eine englische Forschungsgruppe veröffentlichte 2007 ihre Ergebnisse für die NOD2/CARD15-SNPs bei ALL-Patienten ( $n = 196$ ), bei denen der Großteil eine in vivo T-Zelldepletion erhalten hatte (Mayor et al. 2007). Auch sie konnten ein verringertes Gesamtüberleben für Empfänger-Spender-Paare demonstrieren, bei denen beide Träger einer NOD2/CARD15-Variante waren (Log-Rank Test,  $p = 0,0087$ ). Im Unterschied zu den deutschen Gruppen zeigte sich hier ein deutlicher Anstieg der Rezidivraten bei unbeeinträchtigtem Verlauf der GVHD (Grays Test,  $p = 0,001$ , Mayor et al. 2007).

Madrigal et al. untermauern diese Ergebnisse bei Patienten mit akuter Leukämie. Gelang der Nachweis eines NOD2/CARD15-SNPs sowohl beim Spender, als auch beim Empfänger, stieg die Rezidivrate von 32 % auf 54 % an ( $p = 0,001$ , Madrigal

et al. 2008). Daraus resultierend sank das 3-Jahres Gesamtüberleben im Vergleich zu Patienten mit dem Wildtyp von 44 % auf 22 % ( $p = 0,0087$ ).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben keinen Einfluss auf TRM, Rezidivraten oder das Gesamtüberleben der Kinder. Damit unterstützen die Ergebnisse die Veröffentlichung von Sairafi und Mitarbeitern, die ebenfalls keine Assoziation zwischen NOD2/CARD15-Polymorphismen und dem Gesamtüberleben der Patienten demonstrieren konnten (Sairafi et al. 2008). Eine aktuelle Arbeit aus dem Jahr 2010 bei 390 US-amerikanischen Patienten untermauert zusätzlich die Hypothese, dass NOD2/CARD15-SNPs keinen allgemein gültigen Einfluss auf das Gesamtüberleben bei Patienten nach allo-HSCT zu haben scheint (Nguyen et al. 2010).

### **6.1.5 Grunderkrankung und Alter der Patienten**

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation ist ein therapeutisches Mittel für Patienten mit den verschiedensten Grunderkrankungen. Diese Vielfältigkeit spiegelte sich bei der Betrachtung des Patientenkollektivs wider. Die Diagnosen reichten von malignen, hämatologischen Grunderkrankungen bis hin zu angeborenen Immundefekterkrankungen (s. Abb. 4).

In der aktuellen Literatur fanden sich bis dato lediglich Veröffentlichungen zu erwachsenen Patienten, die auf einen Zusammenhang zwischen dem IL-23R-SNP R381Q und der akuten GVHD nach allo-HSCT untersucht wurden (Elmaagacli et al. 2008, Nguyen et al. 2010). Die Vergleichbarkeit der Empfänger zwischen den Publikationen von Nguyen und Elmaagacli und Mitarbeitern war daraufhin beschränkt, dass bestimmte Erkrankungen eine bedeutend niedrigere Inzidenz im Kindesalter haben. Bei der amerikanischen Gruppe gelangten 31 Patienten (9 %) zur Auswertung, die an einem myelodysplastischen Syndrom litten. Diese hämatologische Erkrankung zeichnet sich durch die Dysplasie aller Zelllinien aus (Benett et al. 2000). Der mittlere Altersdurchschnitt liegt zum Erkrankungsbeginn bei 70 Jahren (Giagounidis et al. 2007).

Auch die chronisch lymphoblastische Leukämie liegt mit einem Patientenalter um die 55 Jahre außerhalb der pädiatrischen Verantwortlichkeit (Bird et al. 2004).



Ähnliche Altersangaben fanden sich in der aktuellen Literatur für die myeloische Form der chronischen Leukämie, die aber im Gegensatz zur CLL bereits im Kindesalter ausbrechen kann (Baccarani et al. 2006).

Entsprechend unterschieden sich die Häufigkeiten der Krankheiten der amerikanischen Gruppe im Vergleich zu dieser Arbeit. 63 % der untersuchten Empfänger (n = 244) von Nguyen et al. litten an einer CML und 13 % an einer ALL (n = 51, Nguyen et al. 2010). Bei den Kindern hingegen lag in 43 % eine ALL und in nur 18 % eine CML zugrunde. Daraus resultierende Unterschiede in den verwendeten Protokollen könnten verschiedenartige Verläufe der GVHD zur Folge haben.

Leider beschränken sich Elmaagacli und Mitarbeiter in ihrem Artikel auf die Einteilung in maligne und nicht-maligne Erkrankungen, weshalb die Diskussion über die Bedeutung der Grunderkrankungen beim Ergebnis des IL-23R-SNPs nur eingeschränkt möglich ist (Elmaagacli et al. 2008).

Eine größere, überregionale Studie mit pädiatrischen Patienten ist demzufolge erforderlich, um die Bedeutung der einzelnen Erkrankungen im Zusammenhang mit dem Einfluss des IL-23R-Genpolymorphismus nach allo-HSCT weiter zu eruieren. Eine geringere Heterogenität der Diagnosen, wie sie in dieser Arbeit der Fall ist, könnte weitere Erkenntnisse über die Bedeutung des IL-23R-SNPs für die einzelnen Krankheitsbilder bringen.

Die unterschiedlichen Grunderkrankungen der Patienten aus aktuellen Veröffentlichungen sind möglicherweise auch ein Erklärungsansatz für die verschiedenen Erkenntnisse bei der Frage nach dem Einfluss der NOD2/CARD15-Polymorphismen.

Madrigal und Mitarbeiter demonstrierten 2008 ein erhöhtes Rezidivrisiko für 205 Patienten mit akuter Leukämie, deren Spender Träger einer SNP-Variante des NOD2/CARD15-Gens waren (Madrigal et al. 2008). Damit bestätigten sie die Ergebnisse von einer englischen Gruppe aus dem Jahr 2007, die bei 196 Patienten mit ALL als erste von einer erhöhten Rezidivrate nach allo-HSCT berichteten, wenn Spender und Empfänger Träger eines NOD2/CARD15-SNPs waren (Mayor et al. 2007). Damit sind dies bis dato die einzigen Arbeiten, die Patienten mit gleichen Grunderkrankungen ausgewertet haben.

Übereinstimmend mit den meisten Publikationen, die ihre Daten zum NOD2/CARD15-Genpolymorphismus präsentiert haben, hat die vorliegende Dissertation neben malignen, hämatologischen Grunderkrankungen auch angeborene Immundefekterkrankungen mit ausgewertet (Holler et al. 2006, Granell et al. 2007, Sairafi et al. 2008, Holler et al. 2008, Nguyen et al. 2010).

Die Annahme, dass die Erkenntnisse für den IL-23R- und die NOD2/CARD15-SNPs aufgrund der Heterogenität der Grunderkrankungen der Kinder falsch positiv bzw. negativ sein könnten, ist daher unwahrscheinlich.

Die vorliegende Promotionsarbeit ist die erste Untersuchung an pädiatrischen Patienten, die einen protektiven Einfluss vom IL-23R-SNP R381Q auf den Verlauf der akuten GVHD nach allo-HSZT demonstrieren konnte. Um ausschließen zu können, dass diese Ergebnisse nicht abhängig von anderen Eigenschaften der Patienten waren, erfolgte eine multivariate Analyse (Ergebnisse s. Tabelle 11).

Unsere Ergebnisse unterstützen die Resultate von Elmaagacli und Nguyen et al., die keinen Einfluss des Alters auf die Häufigkeit der akuten GVHD nach allo-HSZT nachweisen konnten (Elmaagacli et al. 2008, Nguyen et al. 2010).

Mit der einzig größeren Forschungsarbeit aus der Pädiatrie gelang kein Nachweis eines Einflusses der NOD2/CARD-15-SNPs auf die akute GVHD oder das Gesamtüberleben nach allo-HSZT. Dies führt zu der Hypothese, dass das Alter für ein Einflussfaktor den Impact der NOD2/CARD15-Genvarianten nach allogener SZT sein könnte.

Für diese Hypothese spricht die Annahme von Holler, Hassan, Elmaagacli und Mitarbeitern, dass die Genvariante vor allem in der Pathophysiologie der gastrointestinalen GVHD eine bedeutende Rolle spielt (Holler et al. 2004, Hassan et al. 2005, Elmaagacli et al. 2006). Hisamatsu et al. untersuchten Knockout-Mäuse, die kein NOD2/CARD25-Protein produzieren konnten. Infolge dessen zeigten diese im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Anfälligkeit auf bakterielle Infektionen im Ileum (Hisamatsu et al. 2003). Die insuffiziente, antimikrobielle Abwehr könnte neben der chronischen Entzündung auch Risikofaktor für die gastrointestinale GVHD sein. Bedenkt man, dass von einer geringeren Vorschädigung des kindlichen Epithels aufgrund des geringeren Alters auszugehen ist, könnte dies erklären, wes-

halb in dieser Arbeit kein Einfluss der NOD2/CARD15-Polymorphismen auf die Schwere der akuten GVHD nachgewiesen werden konnte.

### **6.1.6 Konditionierung, Prophylaxe und Stammzellquelle**

Die Ergebnisse der verschiedenen Forschungsgruppen wurden von weltweiten Zentren für HSZT ausgewertet. Dementsprechend wichtig ist die Betrachtung der individuellen Vorgehensweisen vor und nach Transplantation und ihres möglichen Einflusses auf die Vergleichbarkeit der Erkenntnisse.

Die Konditionierung erfolgte in dieser Arbeit bei allen Kindern myeloablativ. Die Mehrzahl der Patienten (69 %) erhielt wie in anderen Publikationen Cyclophosphamid und Busulfan (Holler et al. 2004, 2006 und 2008, Granell et al. 2006, Mayor et al. 2007, Sairafi et al. 2008, Nguyen et al. 2010 etc., s. Tab. 4). Im Gegensatz zu den Studien im Erwachsenenbereich wurde der Einsatz von Ganzkörperbestrahlung nur bei 3,9 % der Kinder eingesetzt (Granell et al. 2006: 88 %, Elmaagacli et al. 2006: 78 %, 2008: 71 bzw. 82,8 % usw.). Trotz dieses Unterschiedes im Konditionierungsregime konnte diese Arbeit die Erkenntnisse von Elmaagacli aus dem Jahr 2008 für die akute GVHD im Zusammenhang mit dem IL-23R-SNP unterstützen. Darum ist es unwahrscheinlich, dass die abweichenden Ergebnisse für den Einfluss der NOD2/CARD15-SNPs ursächlich auf den verschiedenartigen Konditionierungen beruhen.

Van der Velden et al. setzten im Gegensatz zu den anderen europäischen Gruppen anstelle von Cyclophosphamid Idarubicin ein und konnten trotzdem einen statistisch signifikanten Einfluss der NOD2/CARD15-Genvarianten in ihrem Patientenkollektiv belegen (van der Velden et al. 2009).

Übereinstimmend mit anderen Arbeiten erhielt der Großteil der Kinder eine GVHD-Prophylaxe (91 %, Holler et al. 2004, 2006 und 2008, Granell et al. 2006, Mayor et al. 2007, Sairafi et al. 2008, van der Velden et al. 2009, Nguyen et al. 2010 etc.). Diese beinhaltete eine Kombinationstherapie aus mit MTX und CSA (64 %), die alleinige Gabe von CSA (20 %) oder MTX nach Transplantation (7 %). In dieser wie in den oben genannten Arbeiten zeigte sich kein Einfluss der verwendeten Prophylaxemedikationen auf den Einfluss der akuten GVHD oder das Gesamtüberleben nach allo-HSZT.

Verschiedene Angaben fanden sich über den Einsatz der T-Zelldepletion und die möglichen Folgen für die den Impact der NOD2/CARD15-Polymorphismen auf den Verlauf nach allogener SZT.

In dieser Arbeit konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Verwendung einer T-Zelldepletion und dem Grad der akuten GVHD nachgewiesen werden.

Granell et al. postulierten 2006 in ihrer Publikation zum Einfluss der NOD2/CARD15-Varianten, dass die Verwendung von T-Zell-depletiertem Spendermaterial Ursache dafür sei, dass in ihrem Patientenkollektiv der Verlauf der akuten GVHD unbeeinträchtigt vom Genotyp des Empfänger-Spender-Paares blieb (Granell et al. 2006). Sairafi et al. argumentierten in ihrem Paper ebenfalls mit der Tatsache, dass alle Patienten, die einen HLA-identischen Fremdspender hatten, eine in vivo T-Zelldepletion mit ATG durchlaufen hatten und erklären sich so, weshalb sie die Ergebnisse von Holler und Mitarbeitern aus den Jahren 2004 und 2006 nicht reproduzieren konnten (Sairafi et al. 2008).

Damit unterstützt die vorliegende Arbeit die Ergebnisse von Granell und Sairafi et al., da ein Großteil der Patienten ebenfalls eine in vivo T-Zelldepletion mit Antikörpern erhielt (s. Tab. 4).

Granell et al. konnten im Gegensatz zu dieser Promotionsarbeit einen Trend zu einer erhöhten Mortalität im rezidivfreien Intervall belegen, wenn der Empfänger im Genotyp Träger eines NOD2/CARD15-SNPs war (Granell et al. 2006). Bei diesem Ergebnis geht jedoch nicht hervor, ob dies tatsächlich Folge des Genotyps oder der T-Zelldepletion war. Die Patienten verstarben alle an pulmonalen Infekten, die ursächlich auch auf eine verlangsamte Rekonstitution des Immunsystems zurück zuführen sein könnten (Martinez et al. 2003)

Die Patienten dieser Forschungsarbeit wurden auch auf einen möglichen Einfluss des verwendeten Spendermaterials untersucht. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Verläufen nach allo-HSCT, wenn periphere Blutstammzellen oder Knochenmark verwendet wurden. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend mit den Angaben aus der aktuellen Literatur.

Nguyen et al. bemerkten in ihrer Veröffentlichung, die keinen Einfluss des IL-23R- oder der NOD2/CARD15-Polymorphismen demonstrieren konnte, dass in der Zeit vor 2003 hauptsächlich Knochenmark verwendet wurde. Darum werden in Zukunft

weitere Arbeiten von Interesse sein, bei denen der Einfluss von PBSZ genauer betrachtet werden kann (Nguyen et al. 2010).

Ein Erklärungsansatz, weshalb in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen NOD2/CARD15-Polymorphismen und der Inzidenz der GVHD nachgewiesen werden konnte, könnte die Heterogenität der Histokompatibilität der Spender dieser Arbeit sein.

Granell, van der Velden und Holler et al. demonstrierten ihre Ergebnisse alle an Patienten, deren Spender ein HLA-identischer Verwandter war (Granell et al. 2006, Holler et al. 2004, 2006 und 2008, van der Velden 2009). Gingen, wie in dieser Arbeit, sowohl HLA-identische Verwandte, als auch Fremdspender mit oder ohne mismatch ein, zeigten sich die unterschiedlichsten Ergebnisse für die Bedeutung der NOD2/CARD15-SNPs (Madrigal et al. 2007, Mayor et al. 2008, Sairafi et al. 2008, Nguyen et al. 2010).

Die Erkenntnisse aus der aktuellen Literatur zeigen, dass zur Klärung der Bedeutung von Single Nukleotid Polymorphismen in Zukunft Studien mit homogenen Gruppen bezüglich ihrer Charakteristika zu wählen sind.

Abschließend gaben Holler et al. in ihrer Publikation aus dem Jahr 2008 zu bedenken, dass neben den untersuchten Einflussfaktoren auch Single Nukleotid Polymorphismen eine Rolle spielen könnten, die bis dato noch nicht identifiziert wurden.

## **6.2 Methodische Diskussion**

Für diese Promotionsarbeit erfolgte die Genotypisierung von 217 Patienten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena, deren allogene HSZT im Zeitraum von 1982 bis 2007 stattfand.

Dazu wurde DNA aus kryokonservierten Knochenmarkszellen und peripheren Blutstammzellen isoliert. Es ist nicht auszuschließen, dass es durch den Einfrier- und/oder Auftauprozess zu Schädigungen in der DNA und folglich zu falsch negativen Ergebnissen gekommen ist. Welche Auswirkungen die lange Lagerungszeit

mancher Proben auf die Stabilität des DNA-Gerüsts hatte, ist ebenfalls nicht sicher abzuschätzen.

Nicht von allen Patienten und Spendern stand noch in flüssigem Stickstoff konserviertes Material zur Verfügung. Daraufhin erfolgte nach Möglichkeit die Entnahme von Mundschleimhaut zur DNA-Gewinnung. Fehlte Spender-DNA, wurde diese aus den peripheren Blutzellen des Empfängers isoliert. Eine Überprüfung des Chimärismus als Garantie für die ausschließliche Gewinnung von Spender-DNA wurde nicht bei jedem Patienten durchgeführt. Wenn auch unwahrscheinlich bei Patienten in Remission, ist es nicht auszuschließen, dass der Empfänger-genotyp fälschlich als Spender in die Auswertung eingegangen ist.

Eine Untersuchung der Materialien zum selben Zeitpunkt der Behandlung (vor/nach Bestrahlung) ist ebenfalls eine gute Maßnahme zur Objektivierung der Ergebnisse.

## 7 Schlussfolgerung

Die vorliegende Promotionsarbeit untersuchte als erste die Bedeutung von Single Nukleotid Polymorphismen des IL-23-Rezeptorgens und des NOD2/CARD15-Gens im Rahmen der allogenen HSZT im Kindesalter.

Folgende Ergebnisse konnten für die Fragestellungen erzielt werden:

Die Frequenz der SNPs und die Inzidenz der akuten und chronischen GVHD bei Kindern entsprechen den Angaben aus der aktuellen Literatur.

Allein der Nachweis des IL-23R-SNPs R381Q im Genotyp des Spenders hat einen protektiven Einfluss auf den Schweregrad der akuten GVHD nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation im Kindesalter.

Die NOD2/CARD15-SNPs 8, 12 und 13 haben weder einen Einfluss auf die GVHD noch auf das Gesamtüberleben im Kindesalter.

Die Grunderkrankung und das Alter der Patienten, das Konditionierungsregime, die Form der GVHD-Prophylaxe und die verwendete Stammzellquelle beeinflussen nicht die Inzidenz der akuten bzw. chronischen GVHD beim Empfänger.

Die Genotypisierung des Spenders ist eine viel versprechende, diagnostische Maßnahme, um die Inzidenz der GVHD bei Kindern, die nicht von einem GVL-Effekt profitieren, nach allogener HSZT zu verringern. Die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers, der gezielt den IL-23-Signaltransduktionsweg inhibiert, ist ebenfalls denkbar.

Um diese Hypothesen zu verifizieren, bedarf es in Zukunft größerer Studien mit einem vergleichbaren Patientenkollektiv.

## 8 Literaturverzeichnis

Aggarwal, Sudeepta; Ghilardi, Nico; Xie, Ming-Hong; Sauvage, Frederic J. de; Gurney, Austin L. (2003): Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. In: The Journal of Biological Chemistry, Jg. 278, H. 3, S. 1910–1914.

Am Hildebrandt, GC Granell M. Urbano-Ispizua A. Wolff D. Hertenstein B. Greinix HT Brenmoehl J. Schulz C. Dickinson Hahn J. Rogler G. Andreesen R. Holler E. (2008): Recipient NOD2/CARD15 variants: a novel independent risk factor for the development of bronchiolitis obliterans after allogeneic stem cell transplantation. In: Biology of Blood and Marrow Transplantation, H. 14, S. 67–74.

Anasetti, C.; Amos, D.; Beatty, P. G.; Appelbaum, F. R.; Bensinger, W.; Buckner, C. D. et al. (1989): Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. In: The New England Journal of Medicine, Jg. 320, H. 4, S. 197–204.

Anasetti, C.; Hansen, J. A. (1994): Effect of HLA incompatibility in marrow transplantation from unrelated and HLA-mismatched related donors. In: Transfusion Science, Jg. 15, H. 3, S. 221–230.

Apperley, J. F.; Jones, L.; Hale, G.; Waldmann, H.; Hows, J.; Rombos, Y. et al. (1986): Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse. In: Bone Marrow Transplantation, Jg. 1, H. 1, S. 53–66.

Armitage, J. O. (1994): Bone Marrow Transplantation. In: The New England Journal of Medicine, Jg. 330, H. 12, S. 827–838.

Baccarani, Michele; Saglio, Giuseppe; Goldman, John; Hochhaus, Andreas; Simonsson, Bengt; Appelbaum, Frederick et al. (2006): Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. In: Blood, Jg. 108, H. 6, S. 1809–1820.

Bacigalupo, A.; Lamparelli, T.; Bruzzi, P.; Guidi, S.; Alessandrino, P. E.; Di Bartolomeo, P. et al. (2001): Antithymocyte globulin for graft-versus-host disease prophylaxis in transplants from unrelated donors: 2 randomized studies from Gruppo



- Italiano Trapianti Midollo Osseo (GITMO). In: *Blood*, Jg. 98, H. 10, S. 2942–2947.
- Balkwill, F.; Mantovani, A. (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? In: *Lancet*, Jg. 357, H. 9255, S. 539–545.
- Banchereau, J.; Steinman, R. M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature*, Jg. 392, H. 6673, S. 245–252.
- Barge, R. M. Y.; Starrenburg, C. W. J.; Falkenburg, J. H. F.; Fibbe, W. E.; Marijt, E. W.; Willemze, R. (2006): Long-term follow-up of myeloablative allogeneic stem cell transplantation using Campath "in the bag" as T-cell depletion: the Leiden experience. In: *Bone Marrow Transplantation*, Jg. 37, H. 12, S. 1129–1134.
- Barrett, A. J.; Horowitz, M. M.; McCarthy, D. M.; Kanfer, E.; Bortin, M. M. (1989): Bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukaemia in first and second remission. In: *Bone Marrow Transplantation*, Jg. 4 Suppl 1, S. 247–249.
- Barrett, A. John; Le Blanc, Katarina (2008): Prophylaxis of acute GVHD: manipulate the graft or the environment? In: *Best practice & Research. Clinical Haematology*, Jg. 21, H. 2, S. 165–176.
- Beatty, P. G.; Clift, R. A.; Mickelson, E. M.; Nisperos, B. B.; Flournoy, N.; Martin, P. J. et al. (1985): Marrow transplantation from related donors other than HLA-identical siblings. In: *The New England Journal of Medicine*, Jg. 313, H. 13, S. 765–771.
- Beck, S.; Trowsdale, J. (2000): The human major histocompatibility complex: lessons from the DNA sequence. In: *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, Jg. 1, S. 117–137.
- Bennett, J. M. (2000): World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. In: *International Journal of Hematology*, Jg. 72, H. 2, S. 131–133.
- Bensinger, W. I.; Appelbaum, F. A.; Demirer, T.; Torok-Storb, B.; Storb, R.; Buckner, C. D. (1995): Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells. In: *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, Jg. 13 Suppl 3, S. 63–70.
- Biggs, J. C.; Szer, J.; Crilley, P.; Atkinson, K.; Downs, K.; Dodds, A. et al. (1992): Treatment of chronic myeloid leukemia with allogeneic bone marrow transplantation after preparation with BuCy2. In: *Blood*, Jg. 80, H. 5, S. 1352–1357.

Billingham, R. E.: The biology of graft-versus-host reactions. In: Harvey lectures, Jg. 62, S. 21–78.

Bjorkman, P. J.; Parham, P. (1990): Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. In: Annual Review of Biochemistry, Jg. 59, S. 253–288.

Blaise, D.; Kuentz, M.; Fortanier, C.; Bourhis, J. H.; Milpied, N.; Sutton, L. et al. (2000): Randomized trial of bone marrow versus lenograstim-primed blood cell allogeneic transplantation in patients with early-stage leukemia: a report from the Société Française de Greffe de Moelle. In: Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, Jg. 18, H. 3, S. 537–546.

Bolwell, B.; Sobecks, R.; Pohlman, B.; Andresen, S.; Rybicki, L.; Kuczkowski, E.; Kalaycio, M. (2004): A prospective randomized trial comparing cyclosporine and short course methotrexate with cyclosporine and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative allogeneic bone marrow transplantation. In: Bone Marrow Transplantation, Jg. 34, H. 7, S. 621–625.

Brown, J. H.; Jardetzky, T. S.; Gorga, J. C.; Stern, L. J.; Urban, R. G.; Strominger, J. L.; Wiley, D. C. (1993): Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. In: Nature, Jg. 364, H. 6432, S. 33–39.

Byrd, John C.; Stilgenbauer, Stephan; Flinn, Ian W. (2004): Chronic lymphocytic leukemia. In: Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program, S. 163–183.

Capon, Francesca; Di Meglio, Paola; Szaub, Joanna; Prescott, Natalie J.; Dunster, Christina; Baumber, Laura et al. (2007): Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis. In: Human Genetics, Jg. 122, H. 2, S. 201–206.

Chao, N. J.; Schmidt, G. M.; Niland, J. C.; Amylon, M. D.; Dagis, A. C.; Long, G. D. et al. (1993): Cyclosporine, methotrexate, and prednisone compared with cyclosporine and prednisone for prophylaxis of acute graft-versus-host disease. In: The New England Journal of Medicine, Jg. 329, H. 17, S. 1225–1230.

Chao, Nelson J. (1999): Graft-versus-host-disease. 2nd ed. Austin: R.G. Landes Co. (Medical Intelligence Unit, 8).

Chao, N. J. (1997): Graft-versus-host disease: the viewpoint from the donor T cell.

In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, Jg. 3, H. 1, S. 1–10.

Cho, Judy H. (2008): The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. In: *Nature Reviews. Immunology*, Jg. 8, H. 6, S. 458–466.

Choo, Sung Yoon (2007): The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. In: *Yonsei Medical Journal*, Jg. 48, H. 1, S. 11–23.

Couriel, Daniel; Hosing, Chitra; Saliba, Rima; Shpall, Elizabeth J.; Andelini, Paolo; Popat, Uday et al. (2006): Extracorporeal photopheresis for acute and chronic graft-versus-host disease: does it work? In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, Jg. 12, H. 1 Suppl 2, S. 37–40.

Cua, Daniel J.; Sherlock, Jonathan; Chen, Yi; Murphy, Craig A.; Joyce, Barbara; Seymour, Brian et al. (2003): Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. In: *Nature*, Jg. 421, H. 6924, S. 744–748.

Cyster, Jason G. (2005): Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. In: *Annual Review of Immunology*, Jg. 23, S. 127–159.

den Haan, J. M.; Sherman, N. E.; Blokland, E.; Huczko, E.; Koning, F.; Drijfhout, J. W. et al. (1995): Identification of a graft versus host disease-associated human minor histocompatibility antigen. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 268, H. 5216, S. 1476–1480.

Derry, J. M.; Ochs, H. D.; Francke, U. (1994): Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. In: *Cell*, Jg. 78, H. 4, S. 635–644.

Dubinsky, Marla C.; Wang, Dai; Picornell, Yoana; Wrobel, Iwona; Katzir, Lirona; Quiros, Antonio et al. (2007): IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. In: *Inflammatory Bowel Diseases*, Jg. 13, H. 5, S. 511–515.

Duerr, Richard H.; Taylor, Kent D.; Brant, Steven R.; Rioux, John D.; Silverberg, Mark S.; Daly, Mark J. et al. (2006): A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 314, H. 5804, S. 1461–1463.

Elmaagacli, Ahmet H.; Koldehoff, Michael; Hindahl, Heidrun; Steckel, Nina K.; Trenchel, Rudolf; Peceny, Rudolf et al. (2006): Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation. In: *Transplantation*, Jg. 81, H. 2, S. 247–254.

Elmaagacli, A. H.; Koldehoff, M.; Landt, O.; Beelen, D. W. (2008): Relation of an interleukin-23 receptor gene polymorphism to graft-versus-host disease after hematopoietic-cell transplantation. In: *Bone Marrow Transplantation*, Jg. 41, H. 9, S. 821–826.

Elson, Charles O.; Cong, Yingzi; Weaver, Casey T.; Schoeb, Trenton R.; McClanahan, Terrill K.; Fick, Robert B.; Kastelein, Robert A. (2007): Monoclonal anti-interleukin 23 reverses active colitis in a T cell-mediated model in mice. In: *Gastroenterology*, Jg. 132, H. 7, S. 2359–2370.

Engelhard, V. H. (1994): Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. In: *Annual Review of immunology*, Jg. 12, S. 181–207.

Ferrara, J. L.; Deeg, H. J. (1991): Graft-versus-host disease. In: *The New England Journal of Medicine*, Jg. 324, H. 10, S. 667–674.

Ferrara, J. L.; Levy, R.; Chao, N. J. (1999): Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, Jg. 5, H. 6, S. 347–356.

Ferrara, J. L. (2000): Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors. In: *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research*, Jg. 9, H. 3, S. 299–306.

Ferrara, James L. M.; Levine, John E.; Reddy, Pavan; Holler, Ernst (2009): Graft-versus-host disease. In: *Lancet*, Jg. 373, H. 9674, S. 1550–1561.

Filipovich, Alexandra H.; Weisdorf, Daniel; Pavletic, Steven; Socie, Gerard; Wingard, John R.; Lee, Stephanie J. et al. (2005): National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, Jg. 11, H. 12, S. 945–956.

Filipovich, Alexandra H. (2008): Diagnosis and manifestations of chronic graft-versus-host disease. In: Best Practice & Research. Clinical Haematology, Jg. 21, H. 2, S. 251–257.

Fisher, Ronald Aylmer (1925): Statistical Methods for Research Workers. Edinburgh, London: Oliver and Boyd.

Förster VT. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. Annals of Physics (Leipzig). 2: 55- 75. 1948.

Gale, R. P.; Bortin, M. M.; van Bekkum, D. W.; Biggs, J. C.; Dicke, K. A.; Gluckman, E. et al. (1987): Risk factors for acute graft-versus-host disease. In: British Journal of Haematology, Jg. 67, H. 4, S. 397–406.

Gale, R. P.; Butturini, A. (1990): Bone marrow transplantation in acute lymphoblastic leukemia. In: Cancer Treatment and Research, Jg. 50, S. 223–233.

Gatza, Erin; Rogers, Clare E.; Clouthier, Shawn G.; Lowler, Kathleen P.; Tawara, Isao; Liu, Chen et al. (2008): Extracorporeal photopheresis reverses experimental graft-versus-host disease through regulatory T cells. In: Blood, Jg. 112, H. 4, S. 1515–1521.

Giagounidis, A. A. N.; Germing, U.; Haase, S.; Hildebrandt, B.; Schlegelberger, B.; Schoch, C. et al. (2004): Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. In: Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K, Jg. 18, H. 1, S. 113–119.

Glucksberg, H.; Storb, R.; Fefer, A.; Buckner, C. D.; Neiman, P. E.; Clift, R. A. et al. (1974): Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. In: Transplantation, Jg. 18, H. 4, S. 295–304.

Goker, H.; Haznedaroglu, I. C.; Chao, N. J. (2001): Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. In: Experimental Hematology, Jg. 29, H. 3, S. 259–277.

Goulmy, E.; Schipper, R.; Pool, J.; Blokland, E.; Falkenburg, J. H.; Vossen, J. et al. (1996): Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. In: The New England Journal of Medicine, Jg. 334, H. 5,

S. 281–285.

Greinix, Hildegard T.; Knobler, Robert M.; Worel, Nina; Schneider, Barbara; Schneeberger, Achim; Hoecker, Paul et al. (2006): The effect of intensified extra-corporeal photochemotherapy on long-term survival in patients with severe acute graft-versus-host disease. In: *Haematologica*, Jg. 91, H. 3, S. 405–408.

Griffith, Linda M.; Pavletic, Steven Z.; Lee, Stephanie J.; Martin, Paul J.; Schultz, Kirk R.; Vogelsang, Georgia B. (2008): Chronic Graft-versus-Host Disease--implementation of the National Institutes of Health Consensus Criteria for Clinical Trials. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, Jg. 14, H. 4, S. 379–384.

Hansen, J. A.; Gooley, T. A.; Martin, P. J.; Appelbaum, F.; Chauncey, T. R.; Clift, R. A. et al. (1998): Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. In: *The New England Journal of Medicine*, Jg. 338, H. 14, S. 962–968.

Henckaerts, Liesbet; Vermeire, Séverine (2007): NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. In: *Inflammatory Bowel Diseases*, Jg. 13, H. 2, S. 235–241.

Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. In: *Biotechnology (Nature Publishing Company)*, Jg. 10, H. 4, S. 413–417.

Hildebrandt, Gerhard C.; Granell, Miquell; Urbano-Ispizua, Alvaro; Wolff, Daniel; Hertenstein, Bernd; Greinix, Hildegard T. et al. (2008): Recipient NOD2/CARD15 variants: a novel independent risk factor for the development of bronchiolitis obliterans after allogeneic stem cell transplantation. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, Jg. 14, H. 1, S. 67–74.

Hill GR, Krenger W. Ferrara J. L. (1997): The role of cytokines in acute graft-versus-host disease. In: *Cytokines, Cellular & Molecular Therapy*, Jg. 3, H. 4, S. 257–266.

Hippenstiel, Stefan (2005): [Pneumococci -- epithelial interaction]. In: *Pneumologie (Stuttgart, Germany)*, Jg. 59, H. 12, S. 895–896.

Hisamatsu, Tadakazu; Suzuki, Manabu; Reinecker, Hans-Christian; Nadeau, Wil-

liam J.; McCormick, Beth A.; Podolsky, Daniel K. (2003): CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. In: *Gastroenterology*, Jg. 124, H. 4, S. 993–1000.

Holler, Ernst; Rogler, Gerhard; Herfarth, Hans; Brenmoehl, Julia; Wild, Peter Johannes; Hahn, Joachim et al. (2004): Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation. In: *Blood*, Jg. 104, H. 3, S. 889–894.

Holler, Ernst; Rogler, Gerhard; Brenmoehl, Julia; Hahn, Joachim; Herfarth, Hans; Greinix, Hildegard et al. (2006): Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination. In: *Blood*, Jg. 107, H. 10, S. 4189–4193.

Holler, Ernst; Hahn, Joachim; Andreesen, Reinhard; Rogler, Gerhard; Brenmoehl, Julia; Greinix, Hildegard et al. (2008): NOD2/CARD15 polymorphisms in allogeneic stem-cell transplantation from unrelated donors: T depletion matters. In: *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jg. 26, H. 2, S. 338-9; author reply 339.

Holler, E.; Rogler, G.; Brenmoehl, J.; Hahn, J.; Greinix, H.; Dickinson, A. M. et al. (2008): The role of genetic variants of NOD2/CARD15, a receptor of the innate immune system, in GvHD and complications following related and unrelated donor haematopoietic stem cell transplantation. In: *International Journal of Immunogenetics*, Jg. 35, H. 4-5, S. 381–384.

Hue, Sophie; Ahern, Philip; Buonocore, Sofia; Kullberg, Marika C.; Cua, Daniel J.; McKenzie, Brent S. et al. (2006): Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. In: *The Journal of Experimental Medicine*, Jg. 203, H. 11, S. 2473–2483.

Hugot, J. P.; Chamaillard, M.; Zouali, H.; Lesage, S.; Cézard, J. P.; Belaiche, J. et al. (2001): Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. In: *Nature*, Jg. 411, H. 6837, S. 599–603.

Hugot, Jean-Pierre; Zaccaria, Isabelle; Cavanaugh, Juleen; Yang, Huiying; Vermeire, Séverine; Lappalainen, Maarit et al. (2007): Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. In: *The American Journal of Gastroen-*

terology, Jg. 102, H. 6, S. 1259–1267.

Hunter, Christopher A. (2005): New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. In: Nature Reviews. Immunology, Jg. 5, H. 7, S. 521–531.

Iwasaki, T.; Fujiwara, H.; Iwasaki, T.; Shearer, G. M. (1986): Loss of proliferative capacity and T cell immune development potential by bone marrow from mice undergoing a graft-vs-host reaction. In: Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 137, H. 10, S. 3100–3108.

Jaramillo, Andrés; Fernández, Félix G.; Kuo, Elbert Y.; Trulock, Elbert P.; Patterson, G. A.; Mohanakumar, T. (2005): Immune mechanisms in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. In: Pediatric Transplantation, Jg. 9, H. 1, S. 84–93.

Johnson, Arthur G. (High yield immunology, 2001): Immunologie auf 70 Seiten. Arthur G. Johnson. Dt. Übers. von Michael Kraft. Stuttgart, New York: Thieme.

Kägi, D.; Vignaux, F.; Ledermann, B.; Bürki, K.; Depraetere, V.; Nagata, S. et al. (1994): Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. In: Science (New York, N.Y.), Jg. 265, H. 5171, S. 528–530.

Kaplan EL, Meier P. (1958): Nonparametric estimation from incomplete observations. In: Journal of American Statistics Association, Jg. 53, S. 457–481.

Karaderi, Tugce; Harvey, David; Farrar, Claire; Appleton, Louise H.; Stone, Millicent A.; Sturrock, Roger D. et al. (2009): Association between the interleukin 23 receptor and ankylosing spondylitis is confirmed by a new UK case-control study and meta-analysis of published series. In: Rheumatology (Oxford, England), Jg. 48, H. 4, S. 386–389.

Kelemen, E.; Szebeni, J.; Petrányi, G. G. (1993): Graft-versus-host disease in bone marrow transplantation: experimental, laboratory, and clinical contributions of the last few years. In: International Archives of Allergy and Immunology, Jg. 102, H. 4, S. 309–320.

Klein, J.; Sato, A. (2000): The HLA system. First of two parts. In: The New England journal of medicine, Jg. 343, H. 10, S. 702–709.

Klingemann, H. G.; Storb, R.; Fefer, A.; Deeg, H. J.; Appelbaum, F. R.; Buckner,



C. D. et al. (1986): Bone marrow transplantation in patients aged 45 years and older. In: *Blood*, Jg. 67, H. 3, S. 770–776.

Korngold, R.; Sprent, J. (1978): Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. In: *The Journal of Experimental Medicine*, Jg. 148, H. 6, S. 1687–1698.

Kubista, Mikael; Andrade, José Manuel; Bengtsson, Martin; Forootan, Amin; Jonák, Jiri; Lind, Kristina et al.: The Real Time-PCR polymerase chain reaction. In: *Molecular Aspects of Medicine*, Jg. 27, H. 2-3, S. 95–125.

Kufer, Thomas A.; Banks, Diana J.; Philpott, Dana J. (2006): Innate immune sensing of microbes by Nod proteins. In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, Jg. 1072, S. 19–27.

Langowski, John L.; Zhang, Xueqing; Wu, Lingling; Mattson, Jeanine D.; Chen, Taiying; Smith, Kathy et al. (2006): IL-23 promotes tumour incidence and growth. In: *Nature*, Jg. 442, H. 7101, S. 461–465.

Langrish, Claire L.; McKenzie, Brent S.; Wilson, Nicholas J.; Waal Malefyt, Rene de; Kastelein, Robert A.; Cua, Daniel J. (2004): IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. In: *Immunological Reviews*, Jg. 202, S. 96–105.

Langrish, Claire L.; Chen, Yi; Blumenschein, Wendy M.; Mattson, Jeanine; Basham, Beth; Sedgwick, Jonathan D. et al. (2005): IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. In: *The Journal of Experimental Medicine*, Jg. 201, H. 2, S. 233–240.

Lee, Stephanie J.; Klein, John P.; Barrett, A. John; Ringden, Olle; Antin, Joseph H.; Cahn, Jean-Yves et al. (2002): Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse. In: *Blood*, Jg. 100, H. 2, S. 406–414.

Levine, John E.; Paczesny, Sophie; Mineishi, Shin; Braun, Thomas; Choi, Sung W.; Hutchinson, Raymond J. et al. (2008): Etanercept plus methylprednisolone as initial therapy for acute graft-versus-host disease. In: *Blood*, Jg. 111, H. 4, S. 2470–2475.

Lock, Christopher; Hermans, Guy; Pedotti, Rosetta; Brendolan, Andrea; Schadt, Eric; Garren, Hideki et al. (2002): Gene-microarray analysis of multiple sclerosis

lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. In: *Nature Medicine*, Jg. 8, H. 5, S. 500–508.

Loiseau, Pascale; Busson, Marc; Balere, Marie-Lorraine; Dormoy, Anne; Bignon, Jean-Denis; Gagne, Katia et al. (2007): HLA Association with hematopoietic stem cell transplantation outcome: the number of mismatches at HLA-A, -B, -C, -DRB1, or -DQB1 is strongly associated with overall survival. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, Jg. 13, H. 8, S. 965–974.

MacMillan, Margaret L.; Weisdorf, Daniel J.; Wagner, John E.; DeFor, Todd E.; Burns, Linda J.; Ramsay, Norma K. C. et al. (2002): Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, Jg. 8, H. 7, S. 387–394.

Madrigal, Alejandro; Shaw, Bronwen E.: Immunogenetic factors in donors and patients that affect the of hematopoietic stem cell transplantation. In: *Blood Cells, Molecules & Diseases*, Jg. 40, H. 1, S. 40–43.

Martin, P. J.; Hansen, J. A.; Torok-Storb, B.; Moretti, L.; Press, O.; Storb, R. et al. (1988): Effects of treating marrow with a CD3-specific immunotoxin for prevention of acute graft-versus-host disease. In: *Bone Marrow Transplantation*, Jg. 3, H. 5, S. 437–444.

Martin, P. J. (2003): Graft versus host disease: Clinical and pharmacological risk factors for acute graft-versus-host disease after paediatric bone marrow transplantation from matched sibling or unrelated donors. In: *Bone Marrow Transplantation*, Jg. 32, S. 881–887.

Martín-Hernández, M. P.; Arrieta, R.; Martínez, A.; García, P.; Jimenez-Yuste, V.; Hernandez-Navarro, F. (1997): Haploidentical peripheral blood stem cell transplantation with a combination of CD34 selection and T cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis in a patient with severe combined immunodeficiency. In: *Bone Marrow Transplantation*, Jg. 20, H. 9, S. 797–799.

Matte, Catherine C.; Liu, Jinli; Cormier, James; Anderson, Britt E.; Athanasiadis, Ioanna; Jain, Dhanpat et al. (2004): Donor APCs are required for maximal GVHD but not for GVL. In: *Nature Medicine*, Jg. 10, H. 9, S. 987–992.

Mayor, N. P.; Shaw, B. E.; Madrigal, J. A.; Marsh, S. G. E. (2008): No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT: a reply. In: Bone Marrow Transplantation, Jg. 42, H. 12, S. 837–838.

Mayor, Neema P.; Shaw, Bronwen E.; Hughes, Derralyann A.; Maldonado-Torres, Hazael; Madrigal, J. Alejandro; Keshav, Satish; Marsh, Steven G. E. (2007): Single nucleotide polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene are associated with an increased risk of relapse and death for patients with acute leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors. In: Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, Jg. 25, H. 27, S. 4262–4269.

McGeachy, Mandy J.; Cua, Daniel J. (2007): The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies. In: Seminars in immunology, Jg. 19, H. 6, S. 372–376.

Nguyen, Yume; Al-Lehibi, Abed; Gorbe, Elizabeth; Li, Ellen; Haagenson, Michael; Wang, Tao et al. (2010): Insufficient evidence for association of NOD2/CARD15 or other inflammatory bowel disease-associated markers on GVHD incidence or other adverse outcomes in T-replete, unrelated donor transplantation. In: Blood, Jg. 115, H. 17, S. 3625–3631.

Ogura, Y.; Bonen, D. K.; Inohara, N.; Nicolae, D. L.; Chen, F. F.; Ramos, R. et al. (2001): A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. In: Nature, Jg. 411, H. 6837, S. 603–606.

Ogura, Y.; Lala, S.; Xin, W.; Smith, E.; Dowds, T. A.; Chen, F. F. et al. (2003): Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. In: Gut, Jg. 52, H. 11, S. 1591–1597.

Oh, Hakumei; Loberiza, Fausto R.; Zhang, Mei-jie; Ringdén, Olle; Akiyama, Hideki; Asai, Takayoshi et al. (2005): Comparison of graft-versus-host-disease and survival after HLA-identical sibling bone marrow transplantation in ethnic populations. In: Blood, Jg. 105, H. 4, S. 1408–1416.

Oppmann, B.; Lesley, R.; Blom, B.; Timans, J. C.; Xu, Y.; Hunte, B. et al. (2000): Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. In: Immunity, Jg. 13, H. 5, S. 715–725.

Ottinger, H.; Grosse-Wilde, M.; Schmitz, A.; Grosse-Wilde, H. (1994): Immunoge-

netic marrow donor search for 1012 patients: a retrospective analysis of strategies, outcome and costs. In: Bone Marrow Transplantation, Jg. 14 Suppl 4, S. S34-8.

Paczesny, Sophie; Choi, Sung W.; Ferrara, James L. M. (2009): Acute graft-versus-host disease: new treatment strategies. In: Current Opinion in Hematology, Jg. 16, H. 6, S. 427–436.

Parham, Christi; Chirica, Madaline; Timans, Jacqueline; Vaisberg, Elena; Travis, Marilyn; Cheung, Jeanne et al. (2002): A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. In: Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), Jg. 168, H. 11, S. 5699–5708.

Patriarca, F.; Skert, C.; Sperotto, A.; Damiani, D.; Cerno, M.; Geromin, A. et al. (2004): Incidence, outcome, and risk factors of late-onset noninfectious pulmonary complications after unrelated donor stem cell transplantation. In: Bone Marrow Transplantation, Jg. 33, H. 7, S. 751–758.

Petersdorf, E. W.; Mickelson, E. M.; Anasetti, C.; Martin, P. J.; Woolfrey, A. E.; Hansen, J. A. (1999): Effect of HLA mismatches on the outcome of hematopoietic transplants. In: Current Opinion in immunology, Jg. 11, H. 5, S. 521–526.

Piskin, G.; Tursen, U.; Sylva-Steenland, R. M. R.; Bos, J. D.; Teunissen, M. B. M. (2004): Clinical improvement in chronic plaque-type psoriasis lesions after narrow-band UVB therapy is accompanied by a decrease in the expression of IFN-gamma inducers -- IL-12, IL-18 and IL-23. In: Experimental Dermatology, Jg. 13, H. 12, S. 764–772.

Powles, R.; Mehta, J.; Kulkarni, S.; Treleaven, J.; Millar, B.; Marsden, J. et al. (2000): Allogeneic blood and bone-marrow stem-cell transplantation in haematological malignant diseases: a randomised trial. In: Lancet, Jg. 355, H. 9211, S. 1231–1237.

Przepiorka, D.; Weisdorf, D.; Martin, P.; Klingemann, H. G.; Beatty, P.; Hows, J.; Thomas, E. D. (1995): 1994 Consensus Conference on Acute GVHD Grading. In: Bone Marrow Transplantation, Jg. 15, H. 6, S. 825–828.

Rahman, Proton (2007): Genetics of ankylosing spondylitis: an update. In: Current Rheumatology Reports, Jg. 9, H. 5, S. 383–389.

Remberger, M.; Aschan, J.; Lönnqvist, B.; Carlens, S.; Gustafsson, B.; Hentschke, P. et al. (2001): An ethnic role for chronic, but not acute, graft-versus-host disease

after HLA-identical sibling stem cell transplantation. In: European Journal of Haematology, Jg. 66, H. 1, S. 50–56.

Roos, Izaura M.; Kockum, Ingrid; Hillert, Jan (2008): The interleukin 23 receptor gene in multiple sclerosis: a case-control study. In: Journal of Neuroimmunology, Jg. 194, H. 1-2, S. 173–180.

Rubinstein, P.; Carrier, C.; Scaradavou, A.; Kurtzberg, J.; Adamson, J.; Migliaccio, A. R. et al. (1998): Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. In: The New England Journal of Medicine, Jg. 339, H. 22, S. 1565–1577.

Sairafi, D.; Uzunel, M.; Remberger, M.; Ringdén, O.; Mattsson, J. (2008): No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT. In: Bone Marrow Transplantation, Jg. 41, H. 11, S. 961–964.

Sale, G. E.; Alavaikko, M.; Schaefer, K. M.; Mahan, C. T. (1992): Abnormal CD4:CD8 ratios and delayed germinal center reconstitution in lymph nodes of human graft recipients with graft-versus-host disease (GVHD): an immunohistological study. In: Experimental Hematology, Jg. 20, H. 8, S. 1017–1021.

Sanger, F.; Air, G. M.; Barrell, B. G.; Brown, N. L.; Coulson, A. R.; Fiddes, C. A. et al. (1977): Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. In: Nature, Jg. 265, H. 5596, S. 687–695.

Schmetzer, Oliver (2009): Basics Immunologie. 1. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer.

Schürmann, M.; Valentonyte, R.; Hampe, J.; Müller-Quernheim, J.; Schwinger, E.; Schreiber, S. (2003): CARD15 gene mutations in sarcoidosis. In: The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology, Jg. 22, H. 5, S. 748–754.

Sen, R.; Baltimore, D. (1986): Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. In: Cell, Jg. 47, H. 6, S. 921–928.

Siebenlist, Ulrich; Brown, Keith; Claudio, Estefania (2005): Control of lymphocyte development by nuclear factor-kappaB. In: Nature Reviews. Immunology, Jg. 5, H. 6, S. 435–445.

Sitzmann, Friedrich C.; Bartmann, Peter (2007): Pädiatrie. 300 Tabellen. 3., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Spearman, C. (1904): The proof and measurement of association between two things. In: American Journal of Psychology, Jg. 15, S. 72–101.

Speer, Christian; Gahr, Manfred (Hg.) (2005): Pädiatrie. Mit 410 Tabellen. 2., vollst. neubearb. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer.

Storb, R.; Deeg, H. J.; Whitehead, J.; Appelbaum, F.; Beatty, P.; Bensinger, W. et al. (1986): Methotrexate and cyclosporine compared with cyclosporine alone for prophylaxis of acute graft versus host disease after marrow transplantation for leukemia. In: The New England Journal of Medicine, Jg. 314, H. 12, S. 729–735.

Storb, R.; Deeg, H. J.; Pepe, M.; Appelbaum, F.; Anasetti, C.; Beatty, P. et al. (1989): Methotrexate and cyclosporine versus cyclosporine alone for prophylaxis of graft-versus-host disease in patients given HLA-identical marrow grafts for leukemia: long-term follow-up of a controlled trial. In: Blood, Jg. 73, H. 6, S. 1729–1734.

Storek, J.; Gooley, T.; Siadak, M.; Bensinger, W. I.; Maloney, D. G.; Chauncey, T. R. et al. (1997): Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation may be associated with a high risk of chronic graft-versus-host disease. In: Blood, Jg. 90, H. 12, S. 4705–4709.

Sullivan, K. M.; Agura, E.; Anasetti, C.; Appelbaum, F.; Badger, C.; Bearman, S. et al. (1991): Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. In: Seminars in Hematology, Jg. 28, H. 3, S. 250–259.

Sullivan, K. M.; Deeg, H. J.; Sanders, J.; Klosterman, A.; Amos, D.; Shulman, H. et al. (1986): Hyperacute graft-v-host disease in patients not given immunosuppression after allogeneic marrow transplantation. In: Blood, Jg. 67, H. 4, S. 1172–1175.

Talmadge, James E. (2003): Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy. In: International Immunopharmacology, Jg. 3, H. 8, S. 1121–1143.

Thomas, E. D. (1999): Bone marrow transplantation: a review. In: Seminars in Hematology, Jg. 36, H. 4 Suppl 7, S. 95–103.

Thomas, E. Donnall; Blume, Karl G.; Forman, Stephen J. (1999): Hematopoietic

Cell Transplantation. 2. ed. Malden, Mass.: Blackwell Science.

Thomas, E. Donnall; Blume, Karl G.; Forman, Stephen J.; Appelbaum, Frederick R. (2004): Thomas' hematopoietic cell transplantation. 3. Aufl. Oxford: Wiley-Blackwell.

Truitt, R. L.; Rimm, A. A.; Saltzstein, E. C.; Rose, W. C.; Bortin, M. M. (1976): Graft-versus-leukemia for AKR spontaneous leukemia-lymphoma. In: Transplantation Proceedings, Jg. 8, H. 4, S. 569–574.

Truitt, R. L.; Rose, W. C.; Rimm, A. A.; Bortin, M. M. (1978): Graft versus leukemia. VIII. Selective reduction in antihost reactivity without loss of antileukemic reactivity by treatment of donor mice with lipopolysaccharide. In: Experimental Hematology, Jg. 6, H. 5, S. 488–498.

van den Brink, Marcel R. M.; Burakoff, Steven J. (2002): Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. In: Nature Reviews. Immunology, Jg. 2, H. 4, S. 273–281.

van der Velden, W. J. F. M.; Blijlevens, N. M. A.; Maas, F. M. H. M.; Schaap, N. P. M.; Jansen, J. H.; van der Reijden, B. A. et al. (2009): NOD2 polymorphisms predict severe acute graft-versus-host and treatment-related mortality in T-cell-depleted haematopoietic stem cell transplantation. In: Bone Marrow Transplantation, Jg. 44, H. 4, S. 243–248.

van Limbergen, J.; Russell, R. K.; Nimmo, E. R.; Drummond, H. E.; Smith, L.; Davies, G. et al. (2007): IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. In: Gut, Jg. 56, H. 8, S. 1173–1174.

Venter, J. C.; Adams, M. D.; Myers, E. W.; Li, P. W.; Mural, R. J.; Sutton, G. G. et al. (2001): The sequence of the human genome. In: Science (New York, N.Y.), Jg. 291, H. 5507, S. 1304–1351.

Vogelsang, Georgia B.; Lee, Linda; Bensen-Kennedy, Debra M. (2003): Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. In: Annual Review of Medicine, Jg. 54, S. 29–52.

Wagner, John E.; Gluckman, Eliane (2010): Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. In: Seminars in Hematology, Jg. 47, H. 1, S. 3–12.

Watanabe, Tomohiro; Kitani, Atsushi; Murray, Peter J.; Strober, Warren (2004):

NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. In: *Nature Immunology*, Jg. 5, H. 8, S. 800–808.

Weighardt, Heike; Jusek, Gabriela; Mages, Jörg; Lang, Roland; Hoebe, Kasper; Beutler, Bruce; Holzmann, Bernhard (2004): Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells. In *European Journal of Immunology*, Jg. 34, H. 2, S. 558–564.

Weisdorf, D. J.; Snover, D. C.; Haake, R.; Miller, W. J.; McGlave, P. B.; Blazar, B. et al. (1990): Acute upper gastrointestinal graft-versus-host disease: clinical significance and response to immunosuppressive therapy. In: *Blood*, Jg. 76, H. 3, S. 624–629.

Weisdorf, D.; Hakke, R.; Blazar, B.; Miller, W.; McGlave, P.; Ramsay, N. et al. (1991): Risk factors for acute graft-versus-host disease in histocompatible donor bone marrow transplantation. In: *Transplantation*, Jg. 51, H. 6, S. 1197–1203.

Wong, Chun Kwok; Lit, Lydia Choi Wan; Tam, Lai Shan; Li, Edmund Kwok Ming; Wong, Purple Tsz Yan; Lam, Christopher Wai Kei (2008): Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. In: *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, Jg. 127, H. 3, S. 385–393.

Wysocki, Christian A.; Panoskaltsis-Mortari, Angela; Blazar, Bruce R.; Serody, Jonathan S. (2005): Leukocyte migration and graft-versus-host disease. In: *Blood*, Jg. 105, H. 11, S. 4191–4199.

Xu, J.; Grewal, I. S.; Geba, G. P.; Flavell, R. A. (1996): Impaired primary T cell responses in L-selectin-deficient mice. In: *The Journal of Experimental Medicine*, Jg. 183, H. 2, S. 589–598.

Zintl, F. (1988): [Bone marrow transplantation in childhood. I]. In: *Kinderärztliche Praxis*, Jg. 56, H. 6, S. 259–264.

Zintl, F. (1988): [Bone marrow transplantation in childhood. II]. In: *Kinderärztliche Praxis*, Jg. 56, H. 7, S. 321–327.



## 9 Anhang

### 9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Stadieneinteilung der betroffenen Organe
Tabelle 2:	Schweregradeinteilung der akuten GvHD nach Organmanifestation
Tabelle 3:	Veränderungen der Gensequenz beim IL-23R-SNP und den NOD2/CARD15-SNPs
Tabelle 4:	Konditionierung der Patienten
Tabelle 5:	Zusammenstellung der verwendeten Reagenzien mit Hersteller
Tabelle 6:	Zusammenstellung der verwendeten Geräte mit Hersteller
Tabelle 7:	Primer
Tabelle 8:	SNP-IDs der zu untersuchenden Positionen
Tabelle 9:	Primer-Sonden-Mix für SNP 13 (NOD2/CARD15)
Tabelle 10:	Ergebnisse des exakten Tests nach Fisher: Häufigkeit des Auftretens einer akuten GvHD II-IV° im Zusammenhang mit dem Vorhandensein der vier verschiedenen Single Nukleotid Polymorphismen im Genotyp bei Spender und Empfänger
Tabelle 11:	Vergleich der Spender mit Wildtyp und IL-23-R-1142G>A-Variante

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aufbau des IL-23-Rezeptorkomplexes
- Abbildung 2: Signalweg des IL-23R
- Abbildung 3: Aufbau des NOD2/CARD15-Rezeptors
- Abbildung 4: Grunderkrankungen der Patienten
- Abbildung 5: Prinzip der Amplifikation während der Real-Time PCR
- Abbildung 6: Prinzip des Einbaus einer TaqMan®-Probe während der Real-Time PCR
- Abbildung 7: Externe Darstellung der Detektion freier Reportermoleküle
- Abbildung 8: Externe Darstellung der Ergebnisse der Allelischen Diskriminierung
- Abbildung 9: Akute GVHD bei Spendern mit IL-23R-1142G>A und Wildtyp
- Abbildung 10: Organmanifestationen bei Patienten mit chronischer GVHD
- Abbildung 11: Überlebenszeitanalyse nach Kaplan und Meier
- Abbildung 12: Externe Darstellung des Genotyps von Spender Nr. 245
- Abbildung 13: DNA-Sequenzanalyse von Spender Nr. 245
- Abbildung 14: Externe Darstellung des Genotyps von Spender Nr. 246
- Abbildung 15: DNA-Sequenzanalyse von Spender Nr. 246

## 9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- PD Dr. B. Gruhn (Leiter Sektion Hämatologie/ Onkologie, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena)
- Frau N. Pfaffendorf (Hämatologisch-Onkologisches Labor, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena)
- von Frau I. Wolf (Medizinische Dokumentation, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin Jena)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 08.07.2010

.....

Juliane Intek

## 9.5 Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt an dieser Stelle all den Menschen, die durch ihre fachliche oder emotionale Unterstützung ihren Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn PD Dr. B. Gruhn** für die freundliche Überlassung des Themas und die Möglichkeit, wissenschaftlich arbeiten zu können.

Die ausführliche Einweisung in die Thematik, die zielstrebige Unterstützung bei der Arbeit im Labor und die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts haben einen bedeutenden Anteil zum Abschluss dieser Promotionsarbeit beigetragen.

Die freundliche, kompetente und geduldige Einweisung in die Methoden und Verfahren, sowie die Unterstützung bei der Arbeit im Labor durch **Frau N. Pfaffendorf und Mitarbeiter** gewährleisteten die korrekte Gewinnung und Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit.

Die dazu mühevoll gesammelten und bereit gestellten Daten wurden vor allem durch die fleißige Arbeit von **Frau I. Wolf und Mitarbeitern** ermöglicht. Auch für die zahllosen Stunden Auswertung und Unterstützung bei statistischen Fragestellungen sei an dieser Stelle noch einmal ausdrücklich gedankt.

Kaum denkbar wäre das konzentrierte Erstellen dieser Arbeit ohne die finanzielle und sachliche Unterstützung durch meine **Mutter und meine Familie** gewesen, welche mir durch ihren Ansporn und Stolz immer wieder Motivation in jeder Lebenslage schenkten.

Meinen einzigartigen **Freunden**, die Vorbilder, Kraftgeber, Problemlöser, Ideenschenker und Zuhörer zugleich waren, gilt mein unbezahlbarer Dank.

Als Vorbild mit seiner Disziplin, seinem Fleiß, seinem gesunden Ehrgeiz und als großer Halt während des gesamten Zeitraums sei dem Menschen gedankt, ohne den all das nie entstanden wäre- Danke, **Andi!**